

Technische Universität München
TUM School of Engineering and Design

Photopolymere und additiver Fertigungsprozess zur Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren in der Medizintechnik

Stefan Leonhardt

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Engineering and Design der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr. Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Tim C. Lüth

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Petra Mela

2. Prof. Dr. Sonja Berensmeier

Die Dissertation wurde am 23.08.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Engineering and Design am 10.02.2023 angenommen.

Studienarbeiten

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden am Lehrstuhl für Medizintechnische Materialien und Implantate der TU München unter wesentlicher wissenschaftlicher, fachlicher und inhaltlicher Anleitung des Verfassers die im Folgenden aufgelisteten studentischen Arbeiten. In diesen Arbeiten wurden unterschiedliche Fragestellungen zur Optimierung von Photopolymeren, Analyse von zytotoxischen Eigenschaften, Oberflächenmodifikationen sowie der Entwicklung von Bioreaktorsystem untersucht. Ergebnisse dieser studentischen Arbeiten sind in Teilen in die vorliegende Arbeit eingeflossen.

Bachmeier, Andreas (Semesterarbeit): *Sensorikintegration in 3D-gedruckte Bioreaktoren (2017)*

Blumenschein, Bianca (Bachelorarbeit): *Zytotoxizitätsuntersuchungen additiv gefertigter Probekörper (2016)*

Börmann, Aurélie (Masterarbeit): *Untersuchung der Hämokompatibilität von 3D gedruckten Werkstoffen für medizintechnische Anwendungen (2016)*

Brockmeyer, Tobias (Semesterarbeit): *Additive Fertigung von Bioreaktoren (2016)*

Brunner, Laura (Bachelorarbeit): *Auswirkung von Nachbehandlungsmethoden auf die Biokompatibilität von additiv gefertigten Prüfkörpern (2017)*

Erben, Amelie (Masterarbeit): *Verbesserung des Arbeitsflusses der Zwei-Photonen-Stereolithografie für Life Science Anwendungen: Fertigung von mikrofluidischen Kanalstrukturen mit Methoden der generativen Fertigung zur Integration synthetischer und biologischer Nano- und Mikrostrukturen (2018)*

Felber, Lena (Masterarbeit): *Einfluss von Oberflächenmodifikationen auf die Zytokompatibilität von additiv gefertigten Bauteilen (2017)*

Fischer, Theresa (Semesterarbeit): *Biokompatibilitätsuntersuchungen 3D gedruckter Acrylatprobekörper mittels Flüssigchromatographie, Zellvitalitätstests und Oberflächenanalytik (2016)*

Frey, Jonas (Semesterarbeit): *Entwicklung eines Versuchsaufbaus für die Untersuchung der Wärmeleitfähigkeit additiv gefertigter Werkstoffe (2017)*

Huszár, Marcel (Bachelorarbeit): *Degradierungsverhalten von Photopolymeren für den 3D Druck (2016)*

Lang, Jan (Masterarbeit): *Entwicklung einer Messapparatur zur Bestimmung der Sauerstoffpermeabilität eines Photopolymers für die additive Fertigung (2016)*

Maier, Verena (Bachelorarbeit): *Zytotoxizitätstests additiv verarbeiteter Photopolymere*

Moratilla, Cristina (Bachelorarbeit): *Development and Validation of Different Structuration Processes of 3D-Printed Photopolymer for Fibroblast Adhesion Enhancement (2017)*

Rehekampff, Christoph (Semesterarbeit): *Etablierung eines Verfahrens zur Genotoxizitätsuntersuchung additiv gefertigter Kunststoffbauteile (2017)*

Reidl, Mario (Masterarbeit): *Biologische Validierung und Optimierung von additiv gefertigten Bioreaktoren (2018)*

Rienäcker, Fabiola (Bachelorarbeit): *Zytotoxizitätsuntersuchungen von Photopolymeren für additiv gefertigte Medizinprodukte (2016)*

Schmid, Richard (Masterarbeit): *Versuche zur Kultivierung von stromalem Spendergewebe, sowie Entwicklung eines Bioreaktors zur Kultivierung von cornealem Gewebe (2017)*

Publikationsliste

Im Folgenden sind alle Publikationen gelistet, in welche Teile aus dieser Dissertation eingeflossen sind:

- Damiati, S.; Peacock, M.; Leonhardt, S.; Damiati, L.; Baghdadi, M. A.; Becker, H.; Kodzius, R.; Schuster, B.: Embedded disposable functionalized electrochemical biosensor with a 3D-printed flow cell for detection of hepatic oval cells (HOCs). *Genes* **9** (2), 2018, 418-421
- Düregger, K.; Trik, S.; Leonhardt, S.; Eblenkamp, M.: Additive-manufactured microporous polymer membranes for biomedical in vitro applications. *Journal of Biomaterials Applications* **33** (1), 2018, 116-126
- Schmid, R.; Tarau, I.-S.; Rossi, A.; Leonhardt, S.; Schwarz, T.; Schuerlein, S.; Lotz, C.; Hansmann, J.: In Vivo-Like Culture Conditions in a Bioreactor Facilitate Improved Tissue Quality in Corneal Storage. *Biotechnology Journal* **13** (1), 2018, 1700344
- Eblenkamp, M.; Düregger, K.; Leonhardt, S.: Biomimicry - One Layer at a Time: High-Function Integrated Plastics Systems for the Cell-Based Laboratory Medicine. *Kunststoffe international* **6-7/2017**, 2017, 44-46
- Eblenkamp, M.; Düregger, K.; Leonhardt, S.: Schichtweise zu lebensnaher Biomimikry: Hochfunktionsintegrierte Kunststoffsysteme für die zellbasierte Labormedizin. *Kunststoffe* **6/2017**, 2017, 44-46
- Leonhardt, S.; Klare, M.; Scheer, M.; Fischer, T.; Cordes, B.; Eblenkamp, M.: Biocompatibility of photopolymers for additive manufacturing. *Current Directions in Biomedical Engineering* **2** (1), 2016, 113-116
- Leonhardt, S.; Klare, M.; Scheer, M.; Eblenkamp, M.; Huszár, M.; Rienäcker, F.; Wintermantel, E.: How compatible are photopolymers? *Kunststoffe International* **106** (4), 2016, 10-14

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Problemstellung	4
2.1	Tissue Engineering	4
2.2	Bioreaktoren im Tissue Engineering.....	8
2.3	Problemstellungen zur Translation vom Labor an den Patienten.....	12
2.4	Zielsetzung der Arbeit	15
3	Stand der Technik und Stand der Forschung	17
3.1	Bioreaktoren im Stand der Technik	17
3.2	Spezialisierte Bioreaktoren am Stand der Forschung.....	22
3.3	Biokompatible Werkstoffe.....	23
3.4	Technologie und Werkstoffe der additiven Fertigung.....	27
3.4.1	Verfahren der additiven Fertigung und Anwendung in der Medizintechnik	27
3.4.2	Photopolymere	35
3.4.3	Anisotropie in der additiven Fertigung.....	37
3.5	Additive Fertigung und neue medizintechnische Werkstoffe am Stand der Forschung.....	38
3.6	Additive Fertigung von Bioreaktoren am Stand der Forschung.....	41
3.7	Kritik am Stand der Technik	42
4	Eigener Ansatz und Konzept der Arbeit	45
4.1	Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit	45
4.2	Erwartete Vorteile der Verwendung von additiver Fertigung zur Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren.....	46
4.3	Realisierungskonzept, geplante Experimente und realer Einsatz	47
5	Bewertung additiver Fertigungsverfahren hinsichtlich ihrer Eignung zur Fertigung von Bioreaktoren	49
5.1	Verwendeter 3D-Drucker.....	50
5.2	Auswahl des Ausgangswerkstoffes	51
6	Optimierung des Photopolymers für die Realisierung der additiven Fertigung von Bioreaktoren	55
6.1	Zytotoxizität des Ausgangswerkstoff	55
6.2	Identifikation von herauslösbaren, potenziell toxischen Substanzen	58
6.3	Chemische Optimierung des Photopolymers.....	65

6.4	Biologische und mechanische Untersuchung der modifizierten Photopolymer-Synthesen.....	66
6.4.1	Zytotoxizitätstests der unterschiedlichen Synthesen.....	66
6.4.2	Mechanische Untersuchungen.....	68
6.5	Zusammenfassung und optimierte Photopolymersynthese.....	74
7	Experimente mit optimiertem Photopolymer.....	76
7.1	Herstellung der Probekörper für die Experimente.....	76
7.2	Mechanische Untersuchungen des optimierten Photopolymers.....	76
7.3	Beständigkeit gegenüber Heißdampfsterilisation.....	79
7.4	Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	82
7.5	Experimente zur Oberflächenbehandlung.....	87
7.5.1	Experiment zur Transparenz.....	87
7.5.2	Experiment zur Bestimmung des Kontaktwinkels.....	91
7.6	Direkte Besiedelung additiv gefertigter Probekörper.....	93
8	Anwendungsbeispiele und externe Validierung.....	97
8.1	Spezialisierter Durchflussbioreaktor.....	97
8.1.1	Konventionell gefertigter Bioreaktor.....	97
8.1.2	Optimierung des Bioreaktors und Testung der Dichtheit.....	98
8.1.3	Finales Design des Bioreaktors.....	100
8.2	Spezialisierter Bioreaktor zur optimierten Lagerung von Cornea-Gewebe.....	101
8.2.1	Design des 3D-gedruckten Bioreaktors zur dynamischen Lagerung von Cornea-Gewebe.....	102
8.2.2	Experiment zum Vergleich der statischen Lagerung gegenüber der Lagerung im dynamischen 3D-gedruckten Bioreaktor.....	105
8.3	Desktop-Bioreaktorsystem.....	109
8.3.1	Konzept und Anforderungen.....	110
8.3.2	Grundaufbau des Bioreaktors, Temperierungskonzept und CO ₂ -Versorgung.....	111
8.3.3	Versuch zur Kultivierung von Fibroblasten.....	115
8.3.4	Weiterentwicklung des Bioreaktors für Zytotoxizitätstest.....	117
8.3.5	Zytotoxizitätsuntersuchungen mit dem neu entwickelten Bioreaktor.....	121
8.3.6	Weiterentwicklung der Dockingstation und Ausblick.....	124
9	Zusammenfassung und Ausblick.....	126
	Literaturverzeichnis.....	130
	Anhang.....	144

1 Einleitung

Die regenerative Medizin als modernes Feld der Biomedizin beschäftigt sich mit der Therapie von Erkrankungen auf einer zellulären Basis. Das Tissue Engineering als neueres Feld der regenerativen Medizin hat zum Ziel biologisches Gewebe künstlich herzustellen, umso erkranktes Gewebe im Patienten zu heilen oder zu ersetzen. Hierbei wird von so genannten „Tissue Engineering Produkten“ (TEPs) gesprochen. Diese bringen großes Potential für neue Therapien und Behandlungen mit sich.

Visionär in die Zukunft gedacht können Fortschritte in diesen Technologien der Medizin eines Tages vielen Patienten, die auf Grund mangelnder Spenderorgane nicht behandelt werden können, das Leben retten. Aus dem Eurotransplant Jahresbericht 2019 geht hervor, dass in den Mitgliedsstaaten Belgien, Deutschland, Kroatien, Luxemburg, Niederlande, Österreich, Ungarn und Slowenien zum Ende des Jahres 2019 insgesamt 13.986 Patienten auf der Warteliste für ein Spenderorgan stehen, von denen jedoch nur ein Bruchteil ein Spenderorgan erhalten kann (Eurotransplant 2019).

Die künstliche Herstellung von Gewebe ist jedoch ein komplexer Prozess, der hohe Anforderungen an die Umgebungsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, O₂-Konzentration, Schubspannung durch Nährmedium-Fluss, etc.) während des Wachstums erfordert. Weitere Herausforderungen wie die Produktion solcher Gewebe im industriellen Maßstab (Stückzahlen größer eins) unter Einhaltung der Good Manufacturing Practice (GMP) Richtlinien müssen gelöst werden, um Therapien mit künstlichem Gewebe erfolgreich an den Patienten zu bringen (Kami et al. 2013). Einen entscheidenden Schritt zur Lösung der Herausforderungen können spezialisierte Bioreaktorsysteme spielen. Um Kontamination vorzubeugen und aufwendige Reinigungsschritte zu sparen, sollen diese als Single-Use Produkte zur Verfügung stehen.

Bioreaktoren sind Gefäße, welche eine definierte Kontrolle von Umgebungsbedingungen ermöglichen sollen. Die optimalen Umgebungsbedingungen für unterschiedliche Zellarten (Fibroblasten, Osteoblasten, etc.) sowie Gewebe variieren in der Regel auf Grund ihrer spezifischen Anforderungen. Für die Kultivierung dieser Zellen bzw. von Gewebe bestehend aus diesen Zellen können individuelle Bioreaktoren, die hinsichtlich biologischer sowie technischer Auslegung speziell auf den jeweiligen Einsatz zugeschnitten sind, einen großen Mehrwert bieten. Dazu gehört neben einer Optimierung der Strömungsverhältnisse auch die Möglichkeit zur Integration von Sensorik zur Prozessüberwachung oder Prozessregelung, das Einbringen von transparenten Bereichen für optische Analysen oder weitere Funktionsintegrationen. Auch die Reduktion von Baugruppen ist ein wichtiger Aspekt, der gezielt auf die Verhinderung von Kontaminationen bei dem Zusammenbau von Bioreaktoren abzielt.

Damit ein Bioreaktor optimal passend für den jeweiligen Anwendungsfall ist, sind oftmals komplexe Strukturen, Freiformflächen sowie Hinterschnitte für beispielsweise gezielte Strömungsverhältnisse notwendig.

In aktuellen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ein erheblicher klinischer Nutzen von spezialisierten Bioreaktoren ausgeht. In der Regel werden diese Bioreaktoren jedoch in aufwendigen Prozessen mit konventionellen Herstellungsverfahren wie dem Drehen, Fräsen oder Bohren hergestellt. Eine Skalierung der Produktion oder eine Verwendung als Single-Use Produkte ist somit gar nicht oder nur mit hohen Kosten verbunden möglich, was einen Transfer von Therapien unter Einsatz solcher spezialisierten Bioreaktoren vom Labor zum Patienten nicht zulässt.

Mit Hilfe der additiven Fertigung als computergestütztes Herstellungsverfahren kann dies realisiert werden. Die additive Fertigung ermöglicht es, Produkte mit komplexen Strukturen wie Freiformflächen, feine Kanalstrukturen oder Hinterschnitte schnell und reproduzierbar zu fertigen. Dies ist ein neuer Ansatz, für dessen Umsetzung es vor allem folgende Herausforderungen zu bewältigen gilt.

Ein kritischer Punkt bei der Herstellung solcher individualisierten Bioreaktoren ist die Verwendung geeigneter Werkstoffe sowie ein geeigneter Fertigungsprozess mit Hilfe der additiven Fertigung. Hierzu gehört auch die ganzheitliche Betrachtung des Prozesses inklusive Materialvorbereitung, Prozessüberwachung, Bauteilentnahme, Reinigung und Sterilisation. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Fokus auf dem Werkstoff sowie der additiven Fertigung liegen.

Limitierend ist nach aktuellem Stand der Technik die Auswahl an biokompatiblen Werkstoffen für die additive Fertigung. Im Bioreaktor kommen Zellen über mehrere Wochen bis hin zu mehreren Monaten in Kontakt mit den verwendeten Werkstoffen. Diese dürfen keine toxischen Wirkungen auf Zellen oder Gewebe ausüben. Zusätzlich sollen die Werkstoffe sterilisierbar sein und eine geeignete Transparenz aufweisen, um optische Analysen zuzulassen.

Im ersten Schritt war es das Ziel dieser Arbeit, ein geeignetes additives Fertigungsverfahren zu **identifizieren** und dafür einen Werkstoff so zu **optimieren**, dass die Herstellung von zertifizierbaren spezialisierten Bioreaktoren realisiert werden kann.

Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Photopolymer hinsichtlich **herauslösbarer Bestandteile charakterisiert** und **chemisch modifiziert**, um biokompatible Eigenschaften aufzuweisen und auch bei Langzeitkontakt mit biologischem Gewebe keine toxischen Reaktionen hervorzurufen. Weiterhin wurde ein Prozess definiert, um zertifizierbare Bioreaktoren mittels des Digital Light Processing (DLP) Verfahrens herzustellen.

Der Fokus der Arbeit lag auf der **Modifikation der chemischen Zusammensetzung** des Werkstoffes, um eine biologische Verträglichkeit zu gewährleisten. Mit Hilfe von Biokompatibilitätsuntersuchungen wurde die biologische Verträglichkeit des Werkstoffes sowie die Eignung der Prozesskette für die Herstellung von Bioreaktoren evaluiert. Weiterhin wurde das Erfüllen der Anforderung nach Transparenz an definierten Stellen sowie die Sterilisierbarkeit mittels Autoklavierens evaluiert.

Abschließend wurde das entwickelte Photopolymer in Zusammenarbeit mit einem externen Partner im realen Einsatz validiert. Mittels additiver Fertigung wurde aus dem optimierten Photopolymer ein Bioreaktor für die Lagerung von Cornea-Gewebe unter optimierten Bedingungen entwickelt, gedruckt und dem realen Einsatz unterzogen. Ziel war es, durch die optimierte Lagerung den möglichen Zeitraum zwischen Entnahme bei einem Spender bis zum Einsatz bei einem Patienten zu verlängern.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Konzept erarbeitet, um mit Hilfe eines spezialisierten Bioreaktors sowie eines Tischgerätes zur Ansteuerung des Reaktors, Zytotoxizitätstests ohne Vorhandensein eines biologischen Labors durchführen zu können. Ein erster Prototyp des Bioreaktors konnte dessen Eignung zur Durchführung von Zytotoxizitätsuntersuchungen zeigen. Weiterhin konnte mit einem ersten Prototyp des Tischgerätes nachgewiesen werden, dass Fibroblasten in einem Bioreaktor außerhalb eines Biolabors in normaler Büroumgebung über sieben Tage kultiviert werden können.

2 Problemstellung

In diesem Kapitel wird beschrieben, welchen Zweck Bioreaktoren im Bereich des Tissue Engineering haben, und aus welchen Gründen eine zukünftige Herstellung von Bioreaktoren mit Hilfe der additiven Fertigung sinnvoll ist. Es wird erläutert, warum komplexe spezialisierte Bioreaktoren aus medizintechnischer Sicht notwendig sind. Weiterhin wird auf Problemstellungen aus wirtschaftlicher und technischer Sicht hinsichtlich der Herstellung von individualisierten Bioreaktoren eingegangen.

2.1 Tissue Engineering

Der Begriff Tissue Engineering hat seinen Ursprung im Jahre 1989, als er von Charles Vacanti eingeführt wurde. Im Jahr 1993 folgte die Definition des Fachgebietes Tissue Engineering in einer Publikation von Langer et al. (Langer et al. 1993). Klassisch wurde Tissue Engineering in drei Schritte unterteilt:

- Entnahme von Zellen aus dem Körper
- Ansiedeln von Zellen auf einem geeignetem Zellträger (Scaffold)
- Zugeben von Biomolekülen zur Proliferation (Vermehrung) der Zellen

In den Anfangszeiten des Tissue Engineerings wurden die mit Zellen besiedelten Scaffolds zurück in den Körper gebracht, um dort beschädigtes Gewebe zu ersetzen. Der Körper stellt somit den Zellen die benötigte Umgebung bereit, damit diese zu einem zusammenhängenden Gewebe wachsen können.

Eines der Hauptprobleme ist, dass die gezüchteten Gewebe zum Zeitpunkt der Implantation in den Patienten kaum mechanische Festigkeiten aufweisen, um die mechanischen Beanspruchungen im Körper auszuhalten (Lanza et al. 2014). Weiterhin müssen Interaktionen des Transplantats mit dem umgebenden Gewebe am Implantationsort beachtet werden. Ziel ist eine Umwandlung des implantierten Gewebes als Antwort auf die neue Umgebung (Badylak et al. 2002, Lanza et al. 2014, Cohen et al. 2018). Zudem sind limitierende Faktoren wie Nährstofftransport, Sauerstofftransport sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten am Implantationsort zu beachten. Vor allem die Dicke eines Tissue Engineering Implantates hat einen großen Einfluss auf die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff. Die Diffusion von Sauerstoff in Gewebe ist limitiert auf eine Distanz von ca. 100 bis 200 μm und führt daher bei größeren Transplantaten oft zu einem Absterben der inneren Zellen (Muschler et al. 2004, Martin et al. 2005, Freed et al. 2009, Salehi-Nik et al. 2013, Lanza et al. 2014).

Um diese Herausforderungen zu überwinden, führte das United States National Committee on Biomechanics im Jahr 1998 den Begriff „Functional Tissue Engineering“ ein. Ziel war eine stärkere Betrachtung des Einflusses von optimierter Biomechanik. Es wurden sechs Prinzipien für das Functional Tissue Engineering festgelegt (Butler et al. 2000, Guilak 2002):

Problemstellung

1. Verständnis über die *in-vivo* vorherrschenden mechanischen Belastung von gesundem Gewebe aufbauen.
2. Verständnis über die maximalen mechanischen Belastungen von nativem Gewebe bis zum Versagen aufbauen.
3. Die wichtigsten Kennwerte zur Übertragung auf künstlich hergestelltes Gewebe identifizieren und priorisieren.
4. Standards zur Überprüfung des Erfolgs nach Transplantation von Tissue Engineering Implantaten erstellen.
5. *In-vivo* Interaktion von Tissue Engineering Implantaten mit der physiologischen Umgebung nach der Implantation verstehen.
6. Untersuchungen, wie physikalische Faktoren zelluläre Aktivitäten in Bioreaktoren beeinflussen, durchführen und die Frage beantworten, ob durch eine mechanische Stimulation in Bioreaktoren „besseres“ künstliches Gewebe gewinnbar ist.

Das finale Ziel des Functional Tissue Engineerings ist somit ein verbessertes Verständnis zur Optimierung von *in-vitro* Bedingungen, um Gewebe bis hin zu Implantaten zu züchten, die den *in-vivo* Anforderungen entsprechen. Basierend auf dem klassischen Konzept des Tissue Engineering wird die Strategie zur Züchtung von einsetzbarem Gewebe oder Implantaten um den Schritt der *in-vitro* Kultivierung von Gewebe in Bioreaktoren erweitert (vgl. Abbildung 1). Die Herstellung sogenannter Tissue Engineering Produkte (TEPs) beinhaltet Scaffolds, Bioreaktoren, Wachstumsfaktoren sowie mechanische Stimulation (Freed et al. 1998, Lanza et al. 2014). Die *in-vitro* Kultivierungsbedingungen haben einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der strukturellen und mechanischen Eigenschaften des künstlich gezüchteten Gewebes (Lanza et al. 2014).

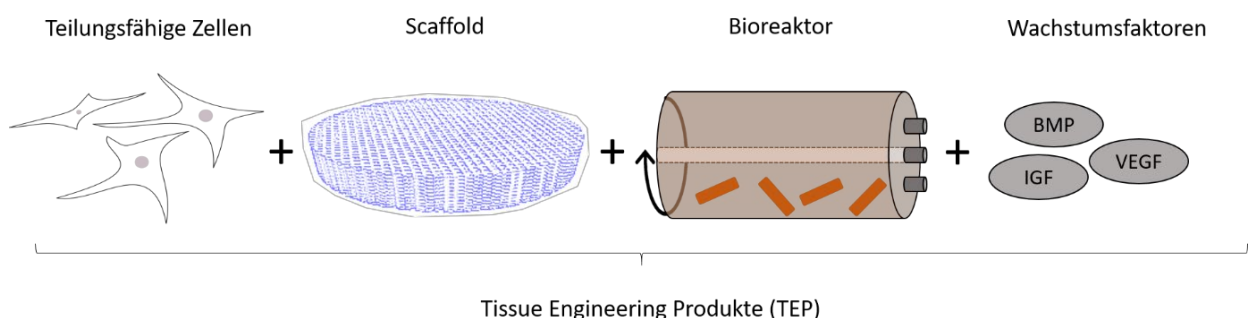


Abbildung 1: Strategie des Tissue Engineerings. Im ersten Schritt werden teilungsfähige Zellen benötigt, welche auf ein Scaffold gesiedelt werden. Das besiedelte Scaffold wird in einen Bioreaktor gegeben, in welchem sich unter Zugabe von Wachstumsfaktoren biologisches Gewebe *in-vitro* ausbilden kann. Das künstlich hergestellte Gewebe wird im letzten Schritt in den Patienten implantiert, wo es am Implantationsort eine Umwandlung und Anpassung vollzieht. Eigene Darstellung in Anlehnung an (Lanza et al. 2014).

Problemstellung

Hauptvoraussetzung für die Herstellung von gezüchtetem Gewebe ist das Vorhandensein von gesunden, teilungsfähigen Zellen. Um Zellen am Leben zu halten, und eine Umgebung zur Proliferation sowie zur Ausbildung von Gewebe zu gewähren, werden im Wesentlichen vier Elemente benötigt:

- Scaffolds als strukturelle Gerüste
- Nährmedien und Wachstumsfaktoren
- Mechanische Stimulierung
- Bioreaktoren zur Umgebungskontrolle

Scaffolds: Eine wichtige Rolle im Bereich des Tissue Engineerings nehmen Scaffolds ein. Sie dienen als Stützstrukturen und bieten den Zellen somit physischen Support, um ein zusammenhängendes Gewebe auszubilden (Langer et al. 1993, Fisher 2013). Werkstoff und Design der Scaffolds müssen so gewählt werden, dass ein An- und Einwachsen von Zellen und der An- bzw. Abtransport von Nährstoffen bzw. Stoffwechselendprodukten gewährleistet wird sowie genug Platz für eine Umwandlung in zusammenhängendes Gewebe vorhanden ist (Van Blitterswijk et al. 2014). In der Regel sind Scaffolds daher porös und bestehen aus einem biodegradablen Werkstoff. Zur Herstellung von Scaffolds eignen sich unterschiedliche Verfahren wie Electrospinning, Pyrogen-Leaching, Schäumen und die additive Fertigung, die in weiterführenden wissenschaftlichen Quellen detailliert eingesehen werden können (Fridrikh et al. 2003, Dehghani et al. 2011, Billiet et al. 2012, Bryers et al. 2012, Melchels et al. 2012, Van Blitterswijk et al. 2014).

Nährmedien und Wachstumsfaktoren: Menschliche Zellen benötigen eine wässrige Umgebung, die möglichst genau die Bedingungen im Körper imitiert. Im Fokus stehen hierbei vor allem die Osmolarität (ca. 350 mOsm) und der pH-Wert (je nach Gewebe ca. 7,4) des Nährmediums (Lanza et al. 2014). Weiterhin muss das Nährmedium weitere Stoffe wie Zucker, Salze, Aminosäuren sowie individuelle Hormone oder Wachstumsfaktoren für den jeweils zu kultivierenden Zelltyp beinhalten (Lanza et al. 2014). Vor allem Wachstumshormone haben einen großen Einfluss auf die Proliferation und das Wachstum von Zellen (Fisher 2013). Der Einfluss von Zellkulturmedium und Wachstumsfaktoren auf das Zellwachstum soll im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter betrachtet werden. Viele Studien wurden hierzu bereits durchgeführt und können in weiterführender Literatur eingesehen werden (Gospodarowicz et al. 1976, Ross et al. 1986, Babensee et al. 2000, Maiorano et al. 2010, Sahoo et al. 2010, Van der Valk et al. 2010, Lee et al. 2011). Zu beachten ist jedoch, dass das Zellkulturmedium keine Wechselwirkungen mit den für die Herstellung von Bioreaktoren verwendeten Werkstoffen eingehen darf.

Mechanische Stimulierung: Neben biochemischen Einflüssen auf Zellen durch beispielsweise Wachstumsfaktoren haben auch mechanische Stimulationen einen maßgeblichen Einfluss auf das Erscheinungsbild und die Funktion von Zellen und Gewebe (Stoltz et al. 2000, Hamill et al. 2001, Alvarez-Barreto et al. 2011, Fisher 2013). Grundsätzlich wird zwischen drei Arten der

Problemstellung

mechanischen Stimulation unterschieden: Zugbelastung, Druckbelastung und Scherbelastung (Bao et al. 2010, Lanza et al. 2014).

Eine Zugbelastung sowie eine Druckbelastung haben jeweils eine Spannung, (Zugspannung oder Druckspannung) zur Folge. Diese ist definiert als Normalkraft pro Fläche:

$$\sigma = \frac{F_N}{A} \quad (1)$$

mit F_N = Normalkraft und A = Fläche (Fisher 2013). Zugspannungen haben in der Regel ein positives Vorzeichen, während Druckspannungen negativ sind.

Auf eine Querebene wirkende Kräfte bewirken eine Scherkraft. Diese ist definiert durch die resultierende Normalkraft pro Scherfläche:

$$\tau = \frac{F_S}{A} \quad (2)$$

mit F_S = resultierende Normalkraft und A = Scherfläche (Fisher 2013).

Als Antwort auf mechanische Stimulation kommt es zu spezifischen Reaktionen abhängig von der Art der Zelle bzw. des Gewebes und der Art der Belastung (Zhu et al. 2000, Fisher 2013). Dazu zählen unter anderem: Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Änderung der Morphologie, Zellausrichtung, Zelladhäsion, Zellwanderung, Produktion von extrazellulärer Matrix oder Zell-Signalgebung (Trepap et al. 2007).

In Blutgefäßen kann eine Umgestaltung der zellulären Gestaltung beobachtet werden, sollte sich die Scherbelastung auf Grund einer Änderung der Durchblutung beispielsweise in Folge von Bluthochdruck umstellen (Lehoux et al. 2006). Weiterhin konnte in Studien gezeigt werden, dass Knorpelgewebe auf Druckbelastung reagiert (Sweigart et al. 2005), die Bildung von Knochenzellen bei mechanischer Belastung zunimmt (Riddle et al. 2009) sowie das Hautwachstum von hornhautbildenden Zellen der Epidermis durch Zugbelastung gefördert wird (Yano et al. 2004).

Es existieren kommerziell erwerbliche Bioreaktoren, die für das Aufbringen unterschiedlicher mechanischen Stimulationen geeignet sind (vgl. Kapitel 3.1). Um die im Körper vorherrschenden mechanischen Belastungen jedoch optimal zu imitieren und die *in-vitro* Bedingungen auf die jeweiligen Zellen bzw. das jeweilige Gewebe abzustimmen, werden in der Regel spezialisierte Bioreaktordesigns benötigt (vgl. Kapitel 3.2).

Bioreaktoren: Die grundlegende Aufgabe von Bioreaktoren im Tissue Engineering ist die Bereitstellung einer sterilen Umgebung, die möglichst präzise *in-vivo* Bedingungen imitiert (Maxson et al. 2011, Lanza et al. 2014). In dieser Umgebung können Zellen sowie Gewebe reproduzierbar gezüchtet, kultiviert oder differenziert werden (Chen et al. 2006, Hansmann et al. 2013, Lanza et al. 2014).

Der Fokus dieser Arbeit soll auf einem geeigneten Werkstoff sowie einem geeigneten Prozess zur Herstellung von spezialisierten Bioreaktorsystem mittels additiver Fertigung liegen. Im Folgenden wird deshalb auf die Funktion von Bioreaktoren eingegangen.

2.2 Bioreaktoren im Tissue Engineering

Bioreaktoren sind Systeme, die für eine optimale Kultivierungsumgebung sorgen sollen und somit maßgeblichen Einfluss auf die Eigenschaften von *in-vitro* kultiviertem oder gezüchtetem Gewebe haben. Ziel ist es, während der Kultivierung möglichst exakt körpereiche Bedingungen zu imitieren. Ein optimales Bioreaktorsystem ist daher in der Lage, alle folgenden Funktionen zu erfüllen (Barron et al. 2003, Martin et al. 2004, Martin et al. 2005, Tandon et al. 2009, Wendt et al. 2009, Iyer et al. 2011, Fisher 2013, Hansmann et al. 2013, Lanza et al. 2014):

- Bereitstellung und Überwachung einer kontrollierten, sterilen Umgebung
- Positive Beeinflussung der anfänglichen Zellverteilung und Zelladhäsion auf dem eingebrachten Scaffold durch optimierte Strömungsverhältnisse
- Bereitstellung von Gasen, Nährstoffen und Wachstumsfaktoren
- Abtransport von Stoffwechselprodukten
- Aufbringen von mechanischer, biochemischer oder elektrischer Stimulation
- Zerstörungsfreie Untersuchung des biologischen Konstrukts

Eines der einfachsten Bioreaktorsysteme ist eine Petrischale gefüllt mit Zellkulturmedium platziert in einem Inkubator, der für eine kontrollierte Umgebungstemperatur und Gaszufuhr sorgt. Bioreaktoren für das Tissue Engineering sind in der Regel komplexere Systeme bestehend aus mehreren Komponenten (vgl. Abbildung 2).

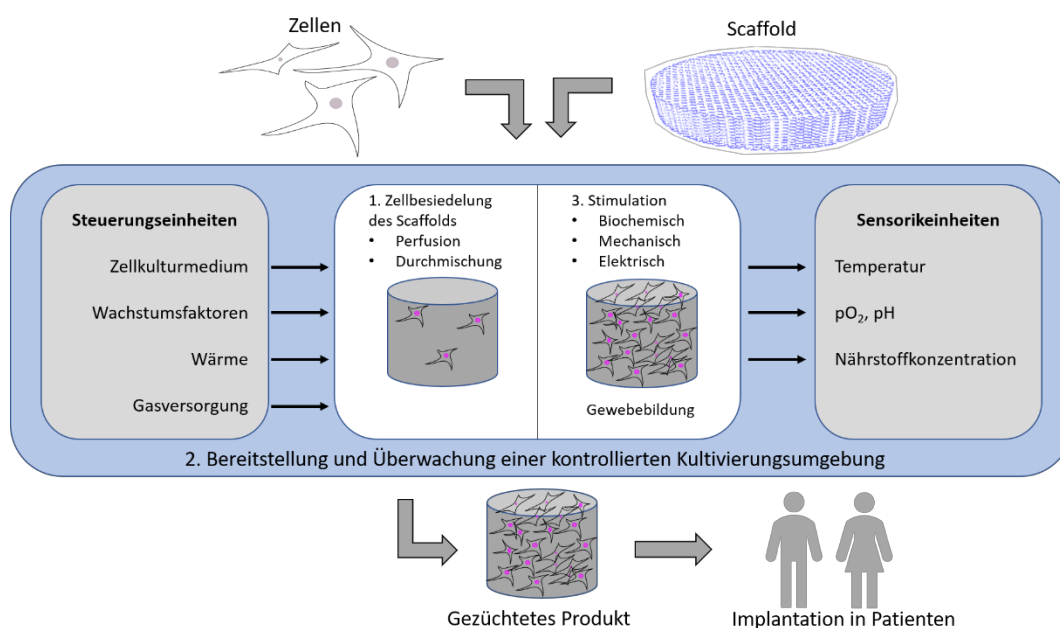


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Bioreaktorsystems. Die Ausbildung von funktionsfähigem Gewebe muss unter definierten und kontrollierten Bedingungen erfolgen. Das Bioreaktorsystem übernimmt dabei folgende Aufgaben: 1. Unterstützung und Beeinflussung des Besiedelungsprozesses auf dem Scaffold. 2. Bereitstellung und Überwachung einer kontrollierten Kultivierungsumgebung. 3. Stimulierung der Zellen bzw. des Gewebes zur Verbesserung der strukturellen und funktionalen Eigenschaften des gezüchteten Gewebes. Eigene Darstellung nach (Wendt et al. 2009).

Besiedelung des Scaffolds: Der einfachste Weg zur Besiedelung eines Scaffolds mit Zellen ist das Pipettieren der Zellsuspension auf das strukturelle Gerüst. Durch die Schwerkraft wird erwartet, dass sich die Zellsuspension gleichmäßig über das poröse Scaffold verteilt (Wendt et al. 2009). Studien zeigen jedoch, dass diese statische Methode der Besiedelung nur eine geringe Effizienz bietet und oftmals zu Inhomogenitäten führt (Freed et al. 1994, Pei et al. 2002, Wendt et al. 2003, Alvarez-Barreto et al. 2007, Wendt et al. 2009).

In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Art und Weise des Besiedelns eines Scaffolds maßgeblichen Einfluss auf die initiale Zelldichte und die Verteilung der Zellen im Scaffold und somit auch Einfluss auf die Proliferation und die Gewebsausbildung hat (Holy et al. 2000, Melchels et al. 2010, Melchels et al. 2011, Van Blitterswijk et al. 2014).

Li, Ma et al. untersuchten die Zellproliferation und Gewebsausbildung von Trophoblast-artigen Zellen auf einem PET-Scaffold in Abhängigkeit der Besiedelungsart. Dabei konnte beobachtet werden, dass bei einer dynamischen Besiedelung, hier eine neu entwickelte Filtrations-Besiedelung, eine signifikant höhere Zelldichte auf dem Scaffold sowie eine homogenere Verteilung der Zellen als bei einer statischen Besiedelung (Pipettieren der Zellsuspension)

erreicht werden konnte. Dies führte zu einer höheren Anzahl von Zellen in der Synthesephase (Replikation der DNA) und einer verlängerten Proliferationsphase (Li et al. 2001).

Alvarez-Barreto, Linehan et al. untersuchten in ihrer Studie den Effekt einer Besiedelung einer Polystyrol-Matrix mit Osteoblasten durch eine oszillierende Strömung im Vergleich zu einer statischen Besiedelung. Es konnte gezeigt werden, dass die dynamische Besiedelung eine effizientere Besiedelung, bessere Homogenität sowie stärkere Matrix-Zell-Interaktion bewirkte (Alvarez-Barreto et al. 2007).

Bioreaktoren, die durch spezielle Designs gezielte Strömungsverhältnisse erzeugen, können somit eingesetzt werden, um die Effizienz, Reproduzierbarkeit und Homogenität der Besiedelung zu verbessern (Zhao et al. 2005, Timmins et al. 2007, Shvartsman et al. 2008, Van Blitterswijk et al. 2014).

Bereitstellung und Überwachung einer kontrollierten Kultivierungsumgebung und des Massentransports: Um den Zellen bzw. dem Gewebe eine optimale Umgebung bereitzustellen, muss der Bioreaktor körpereiche Bedingungen möglichst genau nachstellen. Statische Systeme verfehlen diesen Zweck in der Regel, auf Grund ihrer Limitation hinsichtlich Transport von Nährstoffen und Sauerstoff sowie dem Abtransport von Stoffwechselendprodukten (Lanza et al. 2014). Dynamische Bioreaktorsysteme überwinden diese Limitationen und bieten eine kontrollierte Umgebung (Obradovic et al. 1999, Pörtner et al. 2005, Freed et al. 2006, Hansmann et al. 2013).

Mechanische und elektrische Stimulation: Die Stimulation von Zellen oder Gewebe während der *in-vitro* Kultivierung hat einen maßgeblichen Einfluss auf das Ergebnis des gezüchteten Produkts (Lanza et al. 2014). Zum Aufbringen von mechanischen Kräften auf gezüchtete Konstrukte wurden eine Vielzahl von speziellen Bioreaktoren entwickelt. Mauck et al. konnten zeigen, dass die Funktionalität von gezüchtetem Knorpelgewebe durch das Aufbringen einer Druckbelastung mit Hilfe eines angesteuerten Stempels deutlich erhöht werden konnte (Mauck et al. 2000, Mauck et al. 2002). Das Aufbringen von Scherbelastung wird durch eine gezielte Umströmung des biologischen Konstruktes realisiert (Lanza et al. 2014). Sikavitsas, Bancroft et al. fanden heraus, dass durch die Verwendung eines Bioreaktors, der das Aufbringen von Scherbelastungen erlaubt, die Differentiation aus Stammzellen zu Knochenzellen maßgeblich verbessert werden konnte (Bancroft et al. 2002, Sikavitsas et al. 2003). Xu, Wang et al. benutzten einen Linear-Motor in Verbindung mit einem modularem Bioreaktorsystem zum zyklischen Aufbringen von Zugbelastungen auf ein mit Stammzellen besiedeltes Scaffold. Die zyklische Zugbelastung bewirkte eine deutlich erhöhte Transkriptionstätigkeit, welche eine höhere Zellproliferation sowie Zelldifferentiation zur Folge hatte (Xu et al. 2015).

Elektrochemische Signale sind ein wesentlicher Bestandteil der Zellkommunikation. So können Zellen und Gewebe hinsichtlich ihrer elektrischen Eigenschaften (beispielsweise Membranpotential, Kapazität oder Permittivität) charakterisiert werden. In Abhängigkeit der

Art, des Alters oder des Zustands des Gewebes können die elektrischen Eigenschaften variieren (Markx 2008, Hronik-Tupaj et al. 2012). In verschiedenen Studien konnten anliegende Spannungen während Wundheilungsprozessen oder Gewebsentwicklungsprozessen gemessen werden (Hronik-Tupaj et al. 2012, Lanza et al. 2014). Barash et al. verwendeten in ihrer Studie ein spezialisiertes Bioreaktor-Setup, bestehend aus einem Perfusionsreaktor, in dem Carbon-Stabelektroden eingebracht wurden, um ein besiedeltes Scaffold elektrisch zu stimulieren. Es konnte beobachtet werden, dass die elektrische Stimulation die Ausdehnung der Herzmuskelzellen deutlich erhöht sowie die Ausschüttung bestimmter Proteine für die Zell-Kupplung fördert (Barash et al. 2010). Die positiven Auswirkungen von Integrationen elektronischer Stimulierung in Bioreaktorsysteme kann in weiterführender Literatur eingesehen werden (Serena et al. 2009, Tandon et al. 2010, Balint et al. 2012).

Umgebungs-Monitoring und zerstörungsfreie Untersuchung des biologischen Konstrukts: Bioreaktoren sollen für eine über einen bestimmten Zeitraum definierte Umgebung sorgen. Zu diesen Umgebungsbedingungen zählen unter anderem pH-Wert, Sauerstoffkonzentration im Zellkulturmedium, Strömungsgeschwindigkeiten oder Temperaturverhältnisse (Van Blitterswijk et al. 2014). Zur Überwachung der Umgebungsbedingungen sowie zur Regelung des Prozesses können Sensoren eingesetzt werden. Jeevarajan et al. beschreiben in ihrer Studie beispielsweise die Integration eines Sensors, der basierend auf Lichtabsorption von zugegebenen Phenolrot in Zellkulturmedium den pH-Wert in-line bestimmen kann, in ein Bioreaktorsystem (Jeevarajan et al. 2002). Die Integration solcher Sensorik erfordert oftmals ein spezielles Design des Bioreaktorsystems oder zusätzliche Anschlüsse, was die Kontaminationsgefahr erhöht. In Zeiten der Digitalisierung spezialisieren sich aktuell einige Unternehmen wie beispielsweise die Firma PreSens auf die Herstellung von Single-Use Sensorik zur Integration in Bioreaktorsysteme. Die additive Fertigung bietet auf Grund der großen Designfreiheit optimale Voraussetzungen zur Erstellung spezieller Designs, die eine Integration solcher Sensoren vereinfacht.

Einen weiteren großen Mehrwert zur Prozessüberwachung kann das Einbringen von optisch transparenten Bereichen in ein Bioreaktorsystem mit sich bringen. So kann beispielsweise mit Hilfe eines Mikroskops eine optische Überprüfung von Zellen oder von Gewebe vorgenommen werden. Guez, Cassar et al. beispielsweise beschreiben in ihrer Studie die Integration eines *in-situ* Mikroskops in ein Bioreaktorsystem. Dazu wurde das Mikroskop über ein Portsystem direkt in das Nährmedium eingetaucht, um mit Hilfe einer automatisierten Bildanalyse die Zellkonzentration zu bestimmen (Guez et al. 2004).

Neben dem Mikroskopieren wird in der Literatur vor allem auch die Raman-Spektroskopie für die Überwachung von Zellkulturen untersucht. Abu-ABsi, Kenty et al. untersuchen die mögliche Anwendung der Raman-Spektroskopie zur In-line Überwachung gewisser Zellkultur-Parameter wie beispielsweise den Glucose-Gehalt, den Glutamin-Gehalt oder den Lactat-Gehalt (Abu-ABsi et al. 2011). Neben den hier beschriebenen Methoden zur Überwachung der Zellkulturbedingungen existiert eine Vielzahl von weiteren biologischen und optischen

Sensoren, welche in weiterführender Literatur eingesehen werden können (Ulber et al. 2003, Becker et al. 2007, Abu-Absi et al. 2011).

2.3 Problemstellungen zur Translation vom Labor an den Patienten

Das Potential von TEPs konnte in vielen Studien und Veröffentlichungen gezeigt werden. Eine große Herausforderung liegt jedoch in der Translation aus dem Labor in die Klinik und somit an den Patienten. Für diesen Schritt werden GMP-konforme Herstellverfahren von TEPs benötigt, die eine Großserienfertigung erlauben (Van Blitterswijk and De Boer 2014). Um dieses Ziel zu erreichen, spielen innovative Bioreaktorsysteme, die reproduzierbar und in Serienfertigung hergestellt werden können, eine entscheidende Rolle (Lanza, Langer et al. 2014, Van Blitterswijk and De Boer 2014). Innovative Bioreaktoren sind in der Regel komplexe Produkte und können mit konventionellen Herstellungsverfahren gar nicht oder nur unter extremen Kosten- und Zeitaufwand gefertigt werden. Um das Potential von TEPs an den Patienten zu bringen, müssen folgende im Detail dargestellte Problemstellungen gelöst werden.

Individualisierte Bioreaktorsysteme: Die Verwendung von speziell auf die Applikation und den Patienten zugeschnittenen Bioreaktorsystemen wird als Schlüssel zur reproduzierbaren Fertigung von TEPs, die hinsichtlich Biokompatibilität, mechanischen Eigenschaften und Prozessüberwachung während der Herstellung alle Anforderungen erfüllen, gesehen. In der folgenden Abbildung (Abbildung 3) ist ein Bioreaktorsystem grafisch abgebildet, welches von Maschhoff et al. speziell für eine optimierte Kultivierung von künstlichen Herzgefäßen entwickelt wurde (Maschhoff et al. 2017).

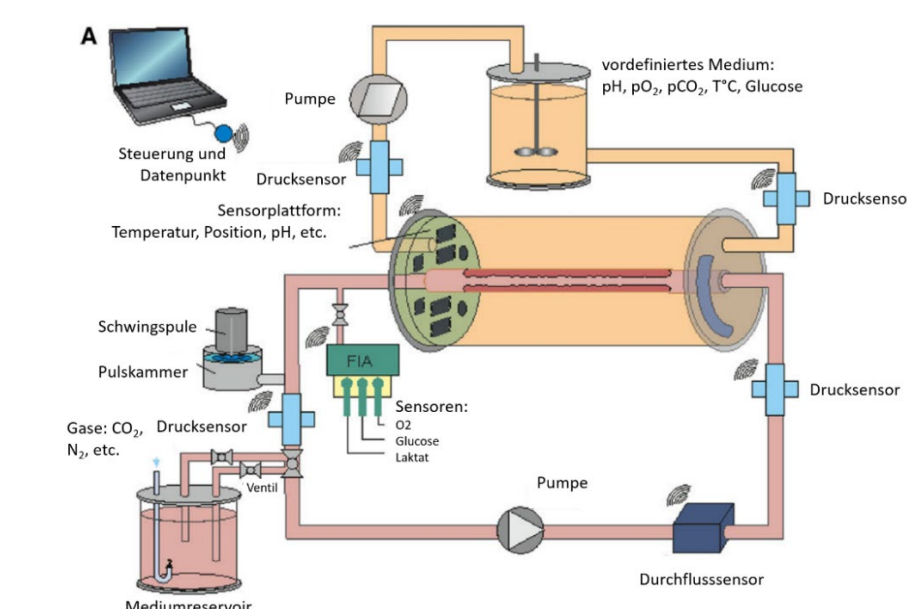


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines individualisierten Bioreaktorsystems zur Kultivierung von künstlichen Herzgefäßen. (Maschhoff et al. 2017).

Problemstellung

Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, wurde ein maßgeschneidertes System mit einem komplexen Setup entwickelt. Um ein Gewebe optimal zu kultivieren und auf seinen Einsatz vorzubereiten, müssen Bioreaktoren oftmals spezielle Designs, Kanalstrukturen bzw. Oberflächen aufweisen, um einen optimalen Nährstofffluss oder definierte mechanische Stimulationen durch Strömungskräfte am Gewebe zu erzeugen (Wendt et al. 2008, Maschhoff et al. 2017, Schuerlein et al. 2017). Solche Designs können heutzutage mit Hilfe von Simulationssoftware wie Ansys, Solidworks Flow Simulation oder anderen berechnet werden. Daraus resultieren komplexe Strukturen wie Freiformflächen, Hinterschnitte oder gekrümmte Kanäle, die mit konventionellen Fertigungstechnologien (beispielsweise Fräsen, Drehen oder Spritzgießen) gar nicht oder nur unter hohem Zeit- und Kostenaufwand hergestellt werden können. Um Produkte mit solchen Strukturen wirtschaftlich sinnvoll zu produzieren, werden **neue Fertigungstechnologien** benötigt.

Auf Grund der aufwendigen Fertigung spezialisierter Bioreaktorsysteme sind diese in der Regel wiederverwendbare Produkte. Einweg-Bioreaktoren haben gegenüber Mehrweg-Bioreaktoren jedoch diverse Vorteile. Durch den einmaligen Einsatz fallen gegenüber mehrfach verwendbaren Bioreaktoren aufwendige Reinigungs- und Sterilisationsprozesse vor dem erneuten Einsatz weg. Dadurch reduzieren sich vor allem aufwendige Validierungs- und Zertifizierungsverfahren, was zu erheblichen Kosteneinsparungen führt (Shukla et al. 2013, Lopes 2015). Ein weiterer Vorteil von Einweg-Bioreaktoren ist die Reduktion der Gefahr von Kreuzkontaminationen, die durch einen mehrfachen Gebrauch desselben Bioreaktors auftreten können.

Aktuell beinhalten Prozesse zum Züchten oder Kultivieren von biologischem Gewebe in der Regel viele händische Schritte, wie Pipettieren, Wechseln von Zellkulturmedien oder Analysieren mit Hilfe eines Mikroskops. Diese Arbeiten werden meistens in teuren Reinräumen (Reinraumklasse A oder B) von geschultem Personal durchgeführt (Van Blitterswijk et al. 2014). Die Vielzahl von händischen Arbeitsschritten bringt die Gefahr von Kontaminationen oder Arbeitsfehlern mit sich (Van Blitterswijk et al. 2014). Geschlossene Bioreaktorsysteme mit integrierten Monitoring-Systemen (beispielsweise Gas-Sensoren, Temperatursensoren oder definierten Stellen zum Mikroskopieren) bieten das Potential, die Reproduzierbarkeit, Transparenz und Qualität der Herstellung von TEPs deutlich zu verbessern.

Abschließend kann gesagt werden, dass *ex-vivo* hergestellte TEPs, die in speziellen Bioreaktorsystemen kultiviert werden, das Potential haben, aktuelle Therapieansätze zu revolutionieren (Martin et al. 2004, Pörtner et al. 2005). Martin et al. sehen jedoch gerade die Translation aus Einzelanfertigungen im Labormaßstab hin zu einer reproduzierbaren Fertigung im industriellen Maßstab als eine der Hauptherausforderungen (Martin et al. 2004). Um dies zu realisieren, werden neue Fertigungsverfahren benötigt.

Neue Fertigungsprozesse zur Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktorsystemen: Bei der Fertigung von komplexen Strukturen stoßen konventionelle Fertigungsverfahren wie das Fräsen, Drehen oder Bohren in der Regel an ihre Grenzen. Kanalstrukturen, Freiformflächen oder Hinterschnitte sind mit diesen Verfahren nicht fertigbar bzw. nur durch Zerlegung des zu fertigen Produktes in viele Einzelteile, was zu langen Produktionszeiten und hohen Kosten führt (Diegel et al. 2010). Um spezialisierte Bioreaktoren an den Patienten zu bekommen, wird ein Fertigungsverfahren benötigt, das folgende Anforderungen erfüllt:

- Wirtschaftlich sinnvolle Serienfertigung von komplexen Strukturen
- Hohe Reproduzierbarkeit im Fertigungsprozess
- Überwachung und Dokumentation der Produktion

Die additive Fertigung bietet das Potential zur Herstellung von zertifizierbaren, spezialisierten Bioreaktoren. Eine Hürde stellen jedoch fehlende Standards sowie validierte und zertifizierte Prozessketten zur Herstellung von Medizinprodukten mittels additiver Fertigung dar (Mellor et al. 2014, Huang et al. 2015, Monzón et al. 2015).

Geeigneter Werkstoff zur Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren mittels additiver Fertigung: Als grundlegende Anforderung gilt die Biokompatibilität aller verwendeten Werkstoffe für die Herstellung von Bioreaktoren. Alle eingesetzten Werkstoffe müssen nach der Norm DIN EN ISO 10993 als biokompatibel zertifiziert sein. Bioreaktoren stehen über einen längeren Zeitraum in Kontakt mit Zellen bzw. biologischem Gewebe, weshalb sich aus den für Bioreaktoren verwendeten Werkstoffen keine toxischen Substanzen herauslösen dürfen. Weiterhin müssen die eingesetzten Werkstoffe sowie der gesamte Bioreaktor sterilisierbar sein, um für die Züchtung oder Kultivierung von biologischem Gewebe eingesetzt werden zu dürfen. Für ein zerstörungsfreies *in-vitro* Monitoring von TEPs werden in der Regel transparente Werkstoffe benötigt. Weiterhin soll es zu keinen Interaktionen zwischen Komponenten des Bioreaktors und der Monitoring-Einheiten mit dem zu kultivierenden Gewebe kommen.

Soll die additive Fertigung für die Herstellung von Bioreaktoren eingesetzt werden, werden Werkstoffe benötigt, die alle Anforderungen erfüllen und in einem geeigneten 3D-Druck-Verfahren verarbeitet werden können. Die Kombination aus geeignetem Werkstoff und geeignetem Prozess ist ein Problem, das aktuell noch nicht gelöst ist und einer der Hauptbestandteile dieser Arbeit ist. In Kapitel 3.4 wird im Detail auf additive Fertigungsverfahren sowie verfügbare Werkstoffe eingegangen. In Kapitel 5 wird deren Eignung zur Herstellung von Bioreaktoren bewertet.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Realisierung der Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren mittels additiver Fertigung. Der Fokus soll hierbei auf kleineren Bioreaktoren mit maximalen Abmaßen von 10 cm x 10 cm x 10 cm liegen, da im Rahmen dieser Arbeit kein 3D-Drucker mit einem größeren Bauraum zur Verfügung stand. Eine Übertragbarkeit auf größere Bioreaktoren wird jedoch als realistisch betrachtet. Um dieses Ziel zu erreichen, sollen im ersten Schritt anhand des Standes der Technik und des Standes der Forschung unterschiedliche Verfahren der additiven Fertigung hinsichtlich der Eignung zur Fertigung von Bioreaktoren bewertet werden. Hierbei sollen auch aktuell verfügbare Werkstoffe der jeweiligen Verfahren betrachtet und bewertet werden.

Im Fokus der Arbeit steht die biologische Validierung eines ausgewählten Werkstoffes sowie die Validierung des gewählten Fertigungsprozesses. Da aktuell keine kommerziell verfügbaren Werkstoffe sowie validierten Verfahren für die Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren existieren, wird ein weiterer Fokus im Rahmen dieser Arbeit auf die Modifikation des ausgewählten Werkstoffes gelegt.

Bioreaktoren stehen in der Regel über mehrere Wochen (abhängig von der jeweiligen Anwendung) in direktem Kontakt mit biologischem Gewebe. Über diesen Zeitraum dürfen sich keine toxischen Substanzen aus den verwendeten Materialien herauslösen. Neben der chemischen Zusammensetzung des Werkstoffes hat auch der Verarbeitungsprozess einen Einfluss auf die biologischen Eigenschaften des Endproduktes. Prozesse die beispielsweise mit UV-aushärtenden Werkstoffen arbeiten, müssen so ausgelegt sein, dass die Vernetzungsreaktionen so ablaufen, dass keine freien Reststoffe vorhanden sind, die sich aus einem fertigen Produkt herauslösen und potenziell toxisch wirken können. Für die Realisierung wurden folgenden Ziele im Detail definiert:

Chemisch und biologisch charakterisierter Werkstoff: In wässriger Umgebung kommt es oftmals zu einem Herauslösen von Werkstoffbestandteilen. Diese Bestandteile können toxische Reaktionen hervorrufen, was zu einem Sterben von Zellen oder Gewebe führt. Mit Hilfe einer Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS) soll untersucht werden, ob bei dem ausgewählten Werkstoff herauslösbare Bestandteile nach der Verarbeitung mit Hilfe der additiven Fertigung zu beobachten sind. Weiterhin soll mit Hilfe von Zytotoxizitätstest in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 10993 untersucht werden, ob der Werkstoff toxische Reaktionen hervorruft. Sind toxische Reaktionen zu beobachten, muss der Werkstoff modifiziert werden, um das Herauslösen von Bestandteilen, welche die toxischen Reaktionen hervorrufen, zu verhindern.

Transparenz: Für den Einsatz optischer Analysemethoden (beispielsweise Phasenkontrast-Mikroskopie oder Raman-Spektroskopie) für ein zerstörungsfreies Monitoring werden transparente Bereiche im Bioreaktor benötigt. Eine Transparenz an definierten Stellen soll

Problemstellung

durch eine gezielte Ausrichtung des Produktes im Bauraum des 3D-Druckers sowie geeigneter Nachbearbeitungsschritte erfolgen.

Single-Use-Produkt: Durch die Verwendung der additiven Fertigung als Produktionsverfahren sollen komplexe Bioreaktoren als Einmalprodukt (disposable) wirtschaftlich gefertigt werden. Ein wesentlicher Bestandteil ist hierbei ein geeignetes Sterilisationskonzept, welches im Rahmen dieser Arbeit definiert werden soll.

Validierung im realen Einsatz: Abschließend soll der Einsatz des optimierten Photopolymers im realen Einsatz evaluiert werden. Dafür soll ein im Rahmen dieser Arbeit entwickelter Bioreaktor für die optimierte Lagerung von Cornea-Gewebe im Einsatz mit tierischen Cornea-Transplantaten untersucht werden. Die biologischen Untersuchungen sollen in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Translationszentrum Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskelettale Erkrankungen (TZKME) durchgeführt werden, um neben internen Versuchen auch eine Evaluierung von externen Partnern zu erhalten. Weiterhin soll ein innovatives Bioreaktorsystem realisiert werden, welches als kompaktes Stand-Alone-System ausgelegt ist und adhärente Fibroblasten ohne biologische Infrastruktur (Biolabor, Brutschrank, etc.) kultivieren kann.

3 Stand der Technik und Stand der Forschung

In diesem Kapitel wird der Stand der Technik von Bioreaktoren dargestellt. Es werden kommerziell erwerbliche Standard-Bioreaktoren, sowie spezialisierte Bioreaktoren aus aktuellen Studien vorgestellt und deren Einsatz im Tissue Engineering aufgezeigt.

Zusätzlich wird das Thema Biokompatibilität als grundlegende Voraussetzung von Werkstoffen, für den Einsatz in der Medizintechnik dargestellt.

Weiterhin werden gängige Verfahren der additiven Fertigung sowie in den jeweiligen Verfahren verarbeitbare Werkstoffe vorgestellt und die Eignung für die Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren bewertet. Anschließend wird vertieft auf das Digital Light Processing eingegangen und Grundlagen zu den in diesem Verfahren verwendeten Photopolymeren vorgestellt.

Am Ende dieses Kapitels wird auf die Defizite des Stands der Technik eingegangen und die ungelösten Problemstellungen zusammengefasst.

3.1 Bioreaktoren im Stand der Technik

Die grundlegende Aufgabe eines Bioreaktors ist es, für die zu züchtenden oder zu kultivierenden biologischen Gewebe bzw. Zellen körperähnliche Umgebungsbedingungen bereitzustellen (Lanza et al. 2014, Van Blitterswijk et al. 2014). Dazu gehören unter anderem Temperatur, pH-Wert, mechanische Stimulation sowie CO₂-Gehalt (Fisher 2013). Der eigentliche Bioreaktor ist dabei in der Regel Bestandteil eines größeren Bioreaktorsystems. Dieses besteht aus mehreren Komponenten wie beispielsweise einem Behältnis für Zellkulturmedium, Sterilfilter, Pumpen und Schläuchen. Oftmals befindet sich das gesamte Bioreaktorsystem in einem Inkubator, der für die Temperatur sowie den CO₂- oder O₂-Gehalt in der Umgebung sorgt. Grundsätzlich lassen sich Bioreaktoren in zwei Gruppen einteilen (Fisher 2013):

- Statische Bioreaktorsysteme
- Dynamische Bioreaktorsysteme

Dynamische Bioreaktoren unterscheiden sich im Wesentlichen von statischen Bioreaktoren dadurch, dass sich bei ihnen durch Fluss von Medium eine Strömung ausbildet, die für einen definierten Nährstofftransport sowie mechanische Stimulationen sorgt. Die einfachsten Formen von statischen Bioreaktoren sind Petri-Schalen sowie T-Flaschen (Fisher 2013). Die Versorgung des biologischen Gewebes innerhalb eines statischen Bioreaktors erfolgt über Diffusion (Vunjak-Novakovic et al. 1999). Schnell wurde jedoch erkannt, dass bei Verwendung statischer Systeme die Inhomogenität der Versorgung mit Nährstoffen sowie Gasen (CO₂ und O₂) ein limitierender Faktor ist (Vunjak-Novakovic et al. 1999, Fisher 2013). Im folgenden

Stand der Technik soll daher nur auf die effizienteren dynamischen Bioreaktoren eingegangen werden.

Für das Züchten sowie Kultivieren von funktionalem biologischen Gewebe ist ein optimaler Nährstofftransport, Abtransport von Stoffwechselprodukten sowie eine definierte Stimulation (mechanisch, elektrisch oder chemisch) essentiell (Barron et al. 2003, Bilodeau et al. 2006). Hierfür ist eine Vielzahl unterschiedlicher dynamischer Bioreaktoren kommerziell erwerblich. Diese Arten von Bioreaktoren sind als Massenware erhältlich und werden in der Regel mittels Spritzgießen hergestellt.

Spinner Flask Bioreaktor

Spinner Flask Bioreaktoren (vgl. Abbildung 4) sind einfache Bioreaktoren, welche eine Konvektionsströmung, also eine Bewegung des Fluids erzeugen, um so den Nährstofftransport zu verbessern sowie biologisches Gewebe mechanisch zu stimulieren (Gaspar et al. 2012). Spinner Flask Bioreaktoren bestehen in der Regel aus einem zylindrischen Grundkörper mit zwei Ein- bzw. Auslässen zum Ein- und Ausbringen von Zellkulturmedium sowie Zellsuspensionen (Gaspar et al. 2012). Scaffolds als dreidimensionale Gerüste für die Zellen hängen über Fäden oder dünne Stäbe von dem Verschluss des Spinner Flask Bioreaktors (Sucosky et al. 2004, Gaspar et al. 2012). Ein Mischelement am Boden des Bioreaktors sorgt für eine Umströmung der Scaffolds. Das Mischelement kann mechanisch angetrieben werden sowie als Magnetrührer am Grund des Bioreaktors ausgelegt sein (Sucosky et al. 2004, Gaspar et al. 2012).

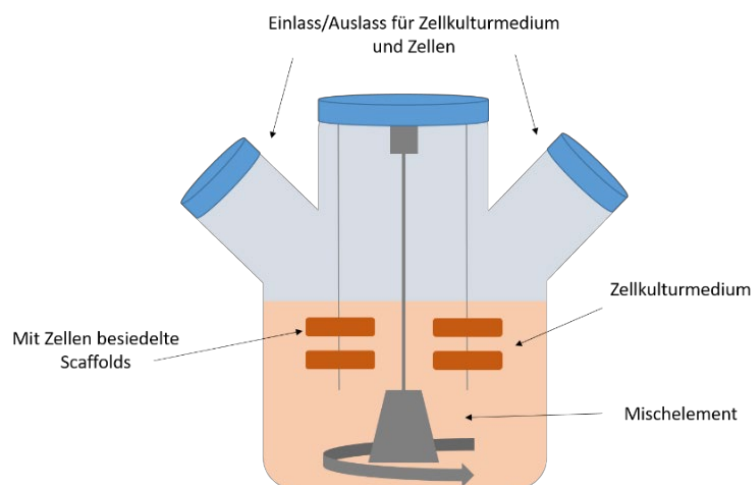


Abbildung 4: Spinner Flask Bioreaktor mit Einlass und Auslass für Zellsuspensionen sowie einem Mischelement. Am Deckel des Bioreaktors sind Scaffolds, zur Besiedelung mit Zellen, aufgehängt.

Spinner Flask Bioreaktoren werden in unterschiedlichen Bereichen des Tissue Engineerings eingesetzt. Dazu zählen beispielsweise Knorpelzüchtung, Knochengewebszüchtung sowie die

Expansion und Differentiation von Stammzellen (Sikavitsas et al. 2002, Chang et al. 2003, King et al. 2007). Spinner Flask Bioreaktoren werden in der Regel aus dem transparenten Thermoplast Polystyrol mittels Spritzgießen oder aus Glas hergestellt.

Rotating Wall Vessel Bioreaktor

Rotating Wall Vessel Bioreaktoren (vgl. Abbildung 5) erlauben eine kontrollierte Versorgung mit Gasen wie Sauerstoff und erzeugen eine leichte mechanische Stimulierung durch Scherkräfte (Gaspar et al. 2012). In der Regel bestehen Rotating Wall Vessel Bioreaktoren aus zwei Zylindern, die konzentrisch zueinander angeordnet sind. Im äußeren mit Zellkulturmedium gefüllten Zylinder, befinden sich Scaffolds als dreidimensionale Gerüste für die Besiedelung mit Zellen. Der innere Zylinder mit einer gaspermeablen Membran sorgt für eine optimale Gasversorgung (in der Regel Sauerstoff). Während der innere Zylinder statisch ausgelegt ist, rotiert der äußere Zylinder, um seine horizontale Mittelachse und erzeugt somit eine Bewegung der Scaffolds in Folge dessen Strömungskräfte auf sie einwirken. Die Kräfte dürfen dabei keine Höhen annehmen, die sich schädlich auf Zellen oder Gewebe auswirken.

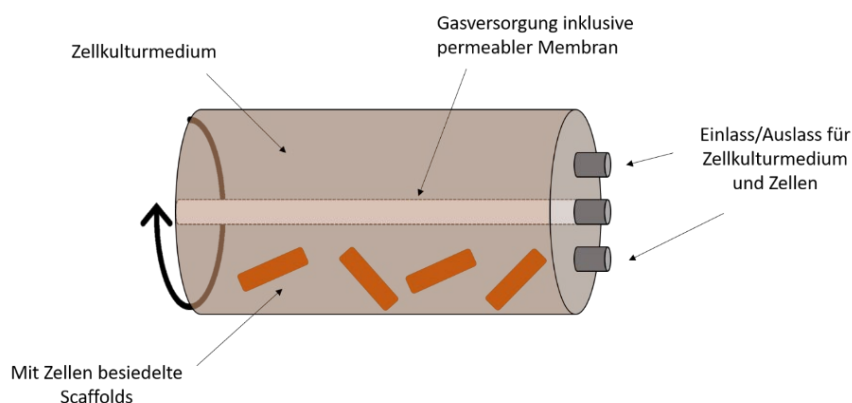


Abbildung 5: Rotating Wall Vessel Bioreaktor mit Einlass und Auslass für Zellsuspensionen sowie einer gaspermeablen Membran.

Rotating Wall Vessel Bioreaktoren finden Einsatz bei der Optimierung von Suspensions-Zellkulturen, der Proliferation von Nierenzellen sowie der Kultivierung von Osterblasten (Schwarz et al. 1992, Granet et al. 1998, Hammond et al. 2001). Rotating Wall Vessel Bioreaktoren bestehen ebenfalls in der Regel aus Polystyrol und werden mittels Spritzgießen als Massenprodukt hergestellt.

Hohlfaserbioreaktor

Hohlfaserbioreaktoren bestehen aus einem Bündel von Medium-durchströmten Hohlfasern. Außerhalb der Fasern adhären Zellen und werden mit Nährstoffen durch die in der Regel poröse Membran der durchströmten Hohlfasern versorgt (Wolff et al. 2013).

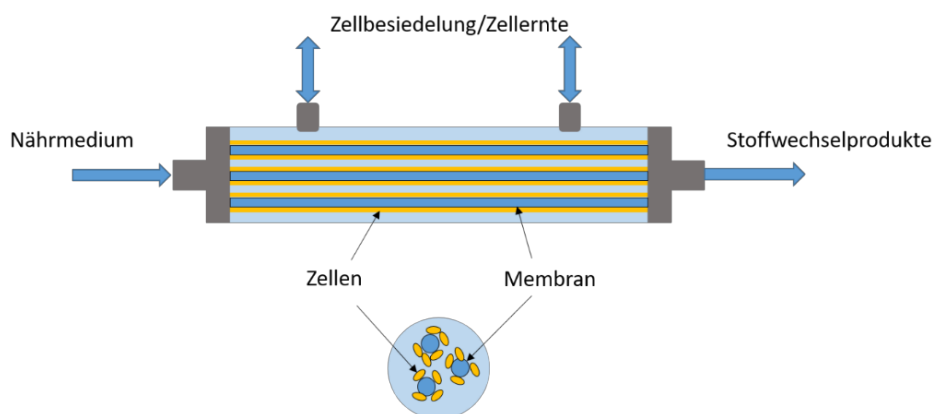


Abbildung 6: Hohlfaserbioreaktor mit Zellkulturmedium-durchströmten Hohlfasern.

Die Hohlfasern verlaufen parallel innerhalb eines Gehäuses. Dadurch entstehen zwei abgetrennte Bereiche: 1) Der intrakapillare Raum (innerhalb der durchströmten Hohlfaser) und 2) der extrakapillare Raum (außerhalb der durchströmten Hohlfasern).

Die Hohlfasern erlauben durch Poren in den Wänden die Kommunikation bzw. den Stoffaustausch zwischen den beiden Bereichen. Der Stofftransport wird hierbei definiert durch den sogenannten „Nominal Molecular Weight Cut-Off“ (MWCO) bzw. die Porengröße. Der MWCO ist definiert als der Wert der minimalen Molekülmasse, welche zu 90 % durch die Membran zurückgehalten wird. Die Versorgung erfolgt durch Diffusion oder auch Konvektion in Abhängigkeit des Transmembrandrucks (De Bartolo 2015).

Für die Hohlfasermembranen werden in der Regel hydrophile, also gut benetzbare Werkstoffe verwendet. Die Hydrophilie begünstigt in der Regel die Adhäsion von Zellen. Beispielsweise können Polysulfone, Polyacrylnitril oder Polyamide eingesetzt werden (De Bartolo 2015).

Der extrakapillare Raum weist in der Regel einen Zugang sowie einen Ausgang auf, welche benutzt werden, um Zellen in das System zu bringen, Proben sowie die gewachsenen Zellen zu entnehmen. Eingebraachte Zellen besiedeln die Oberfläche der Hohlfasern, welche eine Permeabilität für Sauerstoff und Nährstoffe aufweisen und gleichzeitig, durch Stoffwechselaktivitäten entstehende, Stoffe zum Medium passieren lassen, um abtransportiert zu werden. Zusätzlich werden die Zellen von einer Scherbeanspruchung durch das durchströmende Medium geschützt (Das 2007). Analog sind auch Hohlfaserbioreaktorsysteme kommerziell erwerblich, bei denen der intrakapillare Raum und der extrakapillare Raum vertauscht betrieben werden, sodass ein Anwachsen der Zellen im Inneren der Hohlfasern stattfindet (Wung et al. 2014).

Das Prinzip von Hohlfaserbioreaktoren ist seit Jahrzehnten bekannt, jedoch wird mit neuen Designs stetig versucht die Effizienz und Funktionalität von Hohlfaserbioreaktoren zu verbessern. Hohlfaserbioreaktoren finden in unterschiedlichen Bereichen des Tissue Engineerings Einsatz. Das et al. untersuchten mit numerischen Simulationen den Einfluss von

Designparametern auf den Nährstofftransport, um das Züchten von Knochengewebe zu verbessern (Abdullah et al. 2007, Das 2007). Roberts et al. konnten feststellen, dass die Expansion von embryonalen Stammzellen in einem Hohlfaserbioreaktor deutlich effektiver gelingt als mit statischen Systemen (Roberts et al. 2012, Wung et al. 2014). Usuludin et al. zeigten beispielsweise in ihrer Studie wie mit Hilfe eines Hohlfaserbioreaktors ein *in-vitro* Modell zur Untersuchung von Leukämie erstellt werden konnte (Usuludin et al. 2012, Wung et al. 2014).

Perfusionsbioreaktor

Perfusionsreaktoren (vgl. Abbildung 7) weisen gegenüber Spinner Flask und Rotating Wall Vessel Reaktoren Vorteile auf, da sie eine gleichmäßigere Versorgung mit Zellkulturmedium sowie eine bessere Kontrolle über physische Stimulation erlauben (Gaspar et al. 2012). Die Versorgung erfolgt in Perfusionsreaktoren über konvektive Strömung.

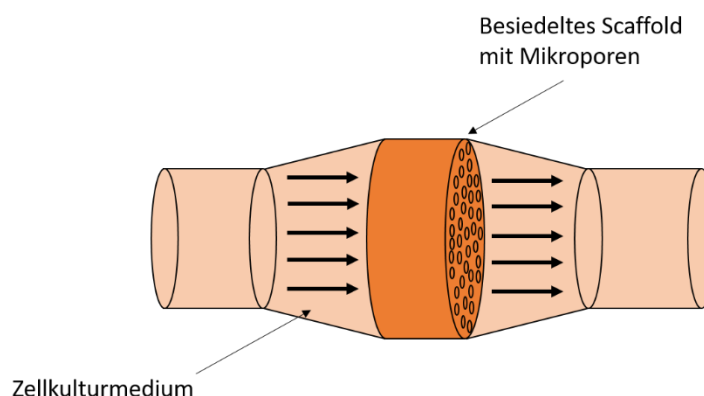


Abbildung 7: Perfusionsbioreaktor mit porösem Scaffold.

In der Regel bestehen Perfusionsbioreaktoren aus einem Zellkulturmedium-Reservoir, einem Pumpsystem, Kanalsystemen sowie einer Kammer, in der Scaffolds platziert sind (Yeatts et al. 2011, Gaspar et al. 2012). Für optimale Flussbedingungen weisen die Scaffolds eine Porosität zwischen 70 % und 99 % auf (Gaspar et al. 2012).

Perfusionsreaktoren werden in unterschiedlichen Bereichen des Tissue Engineerings eingesetzt. Radisic et al. beschrieben in ihrer Studie das Züchten von synchron kontrahierenden Herzmuskelzellen auf porösen Scaffolds mit Hilfe eines Perfusionsreaktors (Radisic et al. 2008). Zhao et al. untersuchten den Einfluss von Scherkräften auf die Bildung dreidimensionaler biologischer Konstrukte von mesenchymalen Stammzellen (Zhao et al. 2007). Perfusionsreaktoren werden aktuell jedoch hauptsächlich im Bereich der Forschung eingesetzt und weisen oftmals spezielle und schwer zu fertigende Strukturen auf.

3.2 Spezialisierte Bioreaktoren am Stand der Forschung

Es wurde bereits erkannt, dass für optimale Kultivierungsbedingungen sowie für neue Forschungen spezialisierte Bioreaktoren benötigt werden (Fisher 2013, Lanza et al. 2014, Van Blitterswijk et al. 2014). Solche Bioreaktorsysteme sind aktuell Stand der Forschung und in der Regel Einzelanfertigungen. Die Verwendung solcher Systeme für die Translation aus dem Labor an den Patienten ist bisher nicht erfolgt. Im Folgenden sollen einige spezialisierte Bioreaktorsysteme aus dem aktuellen Stand der Forschung aufgezeigt werden.

Shen et al. zeigten in ihrer Studie die Entwicklung eines spezialisierten Bioreaktors für die Untersuchung des Einflusses von geringen Scherkräften auf menschliche Endothelzellen (HUVEC) (Shen et al. 2018). Mit der Simulationssoftware COMSOL wurden hydrodynamische Simulationen durchgeführt, um das optimale Kanaldesign für die gewünschte Strömung zu berechnen. Weiterhin wurde der Bioreaktor so ausgelegt, dass ein In-line-Monitoring des biologischen Systems mittels Mikroskopie möglich ist. Um den Bioreaktor fertigen zu können, wurde er in drei Bauteile zerlegt und aus transparentem Polycarbonat und nicht transparentem Polyetheretherketon gefertigt. Für den Einsatz des Bioreaktors waren manuelle Montageschritte sowie die Verwendung mehrerer Dichtungen und Konnektoren notwendig. Das zusammengebaute System wurde in einem Inkubator betrieben, um die Umgebungsbedingungen von 37 °C sowie einen definierten CO₂-Gehalt zu gewährleisten.

Böhme et al. entwickelten einen spezialisierten Bioreaktor, um die Nachteile konventioneller Standardbioreaktoren zu überwinden. Ziel war die Entwicklung eines kostengünstigen Einweg-Bioreaktors für die Zellkultur (Böhme et al. 2017). Das Grundgerüst des Bioreaktors wurde mit Hilfe einer CNC-Fräsmaschine aus einem Polycarbonat-Halbzeug hergestellt. Löcher, Ports und Kanäle wurden mittels Bohrens in einem zweiten Schritt hinzugefügt. Für den Zusammenbau des finalen Bioreaktors wurde Acrylglaskleber verwendet. Eingebunden in ein System von Schläuchen und Pumpen wurde das Bioreaktorsystem für die Untersuchung des Einflusses von periodischer Perfusion auf das Zellwachstum von Fibroblasten in einem Inkubator betrieben.

Sagita et al. entwickelten einen Perfusionsbioreaktor mit einer zusätzlichen Funktion zur elektrischen Stimulation von Zellen und biologischem Gewebe (Sagita et al. 2018). Auf Grund der Komplexität des entwickelten Bioreaktors wurde dieser in mehrere Teile getrennt und zur Herstellung Gussformen mittels CNC-Fräsen aus Aluminium gefertigt. In einem zweiten Schritt wurden diese mit Polydimethylsiloxan ausgegossen und ausgehärtet. Für den Zusammenbau wurden Schrauben und Muttern verwendet.

Schürlein et al. entwickelten am Fraunhofer Translationszentrum Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskelettale Erkrankungen (TZKME) eine vielseitig einsetzbare und modulare Bioreaktorplattform für das Tissue Engineering (Schuerlein et al. 2017). Für die Züchtung von Endothelzellen zur Herstellung künstlicher Blutgefäße wurde ein spezialisierter

Bioreaktor eingesetzt. Der Bioreaktor wurde so ausgelegt, dass ein mit Zellen besiedeltes Scaffold von zwei Seiten laminar umströmt und dadurch mechanisch stimuliert wird. Um die Flussgeometrie realisieren zu können, wurde der Bioreaktor viergeteilt und aufwendig aus Polysulfon gefräst.

In einem weiteren Forschungsprojekt des Fraunhofer Translationszentrum Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskelettale Erkrankungen (TZKME) wurde die Verbesserung der Lagerung von Cornea-Spendergewebe durch die Verwendung eines innovativen Bioreaktors untersucht (Schmid et al. 2018). Der Bioreaktor besteht aus zwei separaten Kreisläufen, sodass einerseits die Endothelschicht der Cornea von Zellkulturmedium umspült wird, und dabei der Augeninnendruck (ca. 15 mmHg) aufgebracht wird. Andererseits ist der Kreislauf so ausgelegt, dass die Epithelschicht des Cornea-Spendergewebes mit Zellkulturmedium beträufelt wird, um so den aufgetragenen Tränenfilm durch den menschlichen Lidschlag zu simulieren. Um die Kreisläufe und Kanalsysteme des Bioreaktors fertigen zu können, wurde er vierteilig mittels Fräsen hergestellt.

Die beiden eben vorgestellten Bioreaktorsysteme des TZKME sollen im Rahmen dieser Arbeit optimiert und mittels additiver Fertigung hergestellt werden. Zusammen mit dem TZKME soll im Anschluss der Bioreaktor zur optimierten Lagerung von Cornea-Gewebe im realen Einsatz getestet werden (vgl. Kapitel 8.2)

3.3 Biokompatible Werkstoffe

Biokompatibilität beschreibt die Verträglichkeit eines biologischen Systems mit einem technischen System bzw. einem Werkstoff (Wintermantel et al. 2008). Dabei kann zwischen Strukturkompatibilität und Oberflächenkompatibilität unterschieden werden (Wintermantel et al. 2008). Übertragen auf Bioreaktorsysteme beschreibt Strukturkompatibilität die Formgebung des Reaktors oder des Scaffolds. Es gilt das Ziel, die Oberflächenstruktur an das mechanische Verhalten von biologischem Gewebe anzupassen. Oberflächenkompatibilität beschreibt die Anpassung von chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften an das biologische System (Wang et al. 2004). Weiterhin wird zwischen inkompatiblen, biokompatiblen, bioinerten sowie bioaktiven Werkstoffen bzw. Oberflächen unterschieden (Schenk 1986, Wintermantel et al. 2008).

- Ein **inkompatibler** Werkstoff setzt toxische Substanzen in einer Konzentration frei, die zu Immunreaktionen, Fremdkörperreaktionen, Entzündungsreaktionen sowie Nekrosen führen kann.
- Ein **biokompatibler** Werkstoff setzt Substanzen in so geringen Konzentrationen frei, sodass es zu keinen toxischen Reaktionen oder einer Änderung des Zellverhaltens kommt.
- Ein **bioinert**er Werkstoff setzt keine toxischen Substanzen frei.

- Ein **bioaktiver** Werkstoff bzw. eine bioaktive Oberfläche führt zu positiven Interaktionen mit Zellen bzw. zu Gewebedifferenzierung. Zellen oder Gewebe adhäreren auf dem Werkstoff bzw. der Oberfläche und es kommt zu einer Proliferation (Zellvermehrung).

Grundvoraussetzung für den Einsatz eines Bioreaktors in der Medizintechnik ist somit die Biokompatibilität der verwendeten Werkstoffe. Die verwendeten Werkstoffe befinden sich in der Regel während des gesamten Anwendungszeitraums in wässriger Umgebung. Es dürfen nur Werkstoffe verwendet werden, die hinsichtlich ihrer herauslösbaren Bestandteile gut charakterisiert sind und bei denen nachgewiesen werden konnte, dass sich über den gesamten Anwendungszeitraum keine Substanzen in toxischen Konzentrationen herauslösen (Williams 2008). Aktuelle Bioreaktoren bestehen aus Edelstahl, Glas, Polyetheretherketon (PEEK), Polyphenylsulfon (PPSU), Polystyrol (PS) oder Polymethylmethacrylat (PMMA). Um neuartige Fertigungsverfahren wie die additive Fertigung einsetzen zu können, werden neue Werkstoffe benötigt, die jedoch erst hinsichtlich ihrer Eignung zur Herstellung von Bioreaktoren evaluiert werden müssen. Um eingesetzt werden zu können, müssen die Werkstoffe als biokompatibel nach der Norm DIN EN ISO 10993 zertifiziert sein. Auf die Eignung aktuell kommerziell verfügbarer Werkstoffe für die Herstellung von Bioreaktoren wird in Kapitel 5 eingegangen.

Zytotoxizitätsuntersuchungen

Medizinprodukte werden hinsichtlich ihres Einsatzortes und der Einsatzzeit in unterschiedliche Klassen (I-III) eingeteilt. Je nach Art der Klasse sind verschiedene Testungen hinsichtlich der biokompatiblen Eigenschaften notwendig (Wintermantel et al. 2008). Die Zytotoxizitätsuntersuchung ist eine grundlegende Untersuchung zur Materialkompatibilität von Medizinprodukten (Wallin et al. 1998). Zur Vermeidung von Tierversuchen, welche durch diverse Normen, Vorschriften und Gesetze reglementiert sind, und die Förderung von Ersatzmethoden, werden hauptsächlich *in-vitro* Methoden eingesetzt (Gstraunthaler et al. 2013).

In der Regel werden bei *in-vitro* Zytotoxizitätsuntersuchungen menschliche Zelllinien fast bis zur Konfluenz in einer 2D-Monolayer-Zellkultur angezogen (Wallin et al. 1998). Anschließend wird die Zellkultur in direkten oder indirekten Kontakt mit dem zu prüfenden Produkt oder Werkstoff gebracht. Alternativ ist auch eine Testung über Extrakte möglich. Nach einer definierten Kultivierungszeit wird die Vitalität der Zellen untersucht und mit einer Negativ- und Positivkontrolle verglichen. Als positives Kontrollmaterial wird ein Werkstoff oder eine Substanz verstanden, die eine reproduzierbare zytotoxische Reaktion hervorruft, während das negative Kontrollmaterial keine zytotoxische Reaktion hervorruft (DIN 2003).

In der Norm DIN EN ISO 10993-5 werden verschiedene Kategorien von Prüfverfahren aufgeführt, wie beispielsweise die Prüfung von Extrakten und die Prüfung mit direktem Kontakt zwischen Zellen und Material (DIN 2003).

Prüfung von Extrakten: Die Extraktion hat zum Ziel, potenziell toxisch wirkende, herauslösbare Substanzen aus zu prüfenden Werkstoffen oder Produkten in einer Flüssigkeit zu lösen. Die Bedingungen der Extraktion sollen möglichst den Bedingungen des klinischen Einsatzes des Produktes entsprechen (DIN 2003). Übertragen auf den Einsatz von Bioreaktoren bedeutet dies Extraktionszeiten von mehreren Wochen bei 37 °C und einem definierten pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4. Als Extraktionsmedium können unterschiedliche Substanzen gewählt werden, bevorzugt wird jedoch Zellkulturmedium, da dies in der Lage ist unpolare sowie polare Substanzen zu extrahieren (DIN 2003). Die Extraktion soll nach der Norm DIN EN ISO 10993-12 in sterilen, chemisch inerten und geschlossenen Behältern erfolgen (DIN 2003). Nach einer definierten Inkubationszeit des Eluats mit der Zellkultur erfolgt die Bestimmung der Zytotoxizität mittels Vitalitätstests.

Kann eine zytotoxische Reaktion nachgewiesen werden, kann mit Hilfe einer Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS) der Überstand untersucht werden, um herausgelöste Bestandteile zu identifizieren.

Prüfung durch direkten Kontakt: Bei der Prüfung durch direkten Kontakt muss darauf geachtet werden, dass der Prüfkörper mindestens eine ebene Oberfläche aufweist. Weiterhin ist der Prüfkörper vor der Untersuchung zu sterilisieren (DIN 2003). Zellkulturen sind bis zur Subkonfluenz anzuzüchten, um anschließend Probekörper möglichst schonend auf die Zellschicht aufzubringen, um physikalische Schädigungen auszuschließen (DIN 2003). Nach einer definierten Inkubationszeit geschieht die Bestimmung der Zytotoxizität mittels Vitalitätstests.

Zelladhäsionstest: Eine weitere Prüfung zur Bestimmung der Biokompatibilität von Werkstoffen sind Zelladhäsionstests (Khalili et al. 2015). Hierfür werden adhärente Zellkulturen direkt auf einen zu prüfenden Werkstoff gesiedelt und eine definierte Zeit inkubiert. Anschließend geschieht die Bestimmung der Zytotoxizität mittels Vitalitätstests.

Die Zelladhäsion spielt eine wesentliche Rolle bei der Kommunikation, Differentiation und Regulation der Zellen. Ein Verständnis darüber ist daher fundamental für die Züchtung von biologischem Gewebe (Khalili et al. 2015). Im Rahmen dieser Arbeit werden Zelladhäsionstests lediglich zur Bestimmung der Zytotoxizität bzw. des Anwachsverhaltens auf Werkstoffen eingesetzt. Diese sollen dazu dienen, um den Werkstoff sowie den Prozess hinsichtlich seiner Eignung zur Herstellung zertifizierbarer Bioreaktoren mittels additiver Fertigung zu bewerten.

Auf die Grundlagen der Adhäsionskinematik sowie chemische, elektrische und physische Phänomene der Zelladhäsion wird deshalb nicht weiter eingegangen. In weiterführender Literatur wird dies aber detailliert aufgeführt (Wintermantel et al. 2008, Gstraunthaler et al. 2013, Khalili et al. 2015).

Vitalitätstest: Vitalitätstests dienen der Bestimmung des Anteils vitaler Zellen. Zur Bestimmung der Vitalität stehen unterschiedliche Tests zur Verfügung, die jeweils unterschiedliche Eigenschaften von Zellen untersuchen, wie beispielsweise die Membranintegrität, Stoffwechselaktivitäten oder Proliferationsfähigkeit (Gstraunthaler et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit werden Tetrazoliumtests zur Messung der Vitalität eingesetzt, weshalb diese im Folgenden detaillierter vorgestellt werden.

Tetrazoliumtests basieren auf biochemischen Reaktionen und messen die Aktivität der mitochondrialen und cytosolischen Dehydrogenasen vitaler Zellen (vgl. Abbildung 8) (Gstraunthaler et al. 2013).

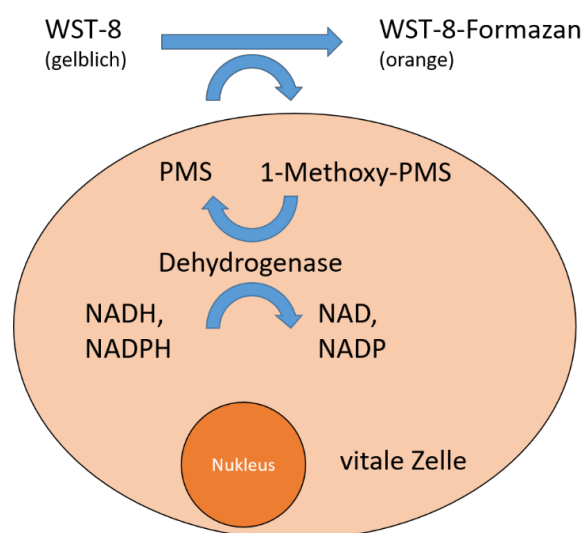


Abbildung 8: Ablauf der chemischen Reaktionen eines Tetrazoliumtests, hier mit WST-8 zur Bestimmung der Zellvitalität.

Als Testsubstanz wird das Tetrazoliumderivat WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monodsodium salt) eingesetzt. WST-8 ist wasserlöslich und farblos bis leicht gelblich (Dojindo-Laboratories 2016). Auf Grund seiner Ladung dringt WST-8 nicht in die Zelle ein, sondern verbleibt in der Inkubationslösung (Gstraunthaler et al. 2013). Über transmembranäre Oxidoreduktasen erfolgt eine Koppelung an intrazellulär ablaufende Dehydrogenasereaktionen (Gstraunthaler et al. 2013). Der Inkubationslösung wird hierfür der Elektronenakzeptor 1-Methoxy-PMS (1-Methoxy-5-Methylphenaziniummethylsulfat) zugegeben, welcher durch NADH bzw. NADPH zu PMS reduziert wird. Dies katalysiert das leicht gelblich WST-8 in oranges WST-8-Formazan (Gstraunthaler et al. 2013). WST-8-Formazan hat einen Absorptionspeak bei einer Wellenlänge

von ca. 450 nm und kann mit einem Microplate-Reader hinsichtlich seiner optischen Dichte untersucht werden. Die optische Dichte korreliert mit der Anzahl vitaler Zellen und kann gegenüber der Negativkontrolle referenziert werden (Dojindo-Laboratories 2016).

3.4 Technologie und Werkstoffe der additiven Fertigung

In diesem Kapitel werden die Grundlagen der additiven Fertigung sowie die unterschiedlichen Verfahren vorgestellt. Der Fokus liegt hierbei auf der polymeren additiven Fertigung. In dieser Arbeit wurde das Digital Light Processing für die Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren ausgewählt. Im Folgenden wird daher das Verfahren sowie die, in diesem Verfahren zu verarbeitenden Photopolymere detailliert vorgestellt.

Die additive Fertigung bezeichnet einen automatisierten, computergestützten Prozess, bei dem auf Basis eines digitalen dreidimensionalen Modells durch lokales Ablegen, Verschmelzen oder Aushärten von Material schichtweise ein dreidimensionales Bauteil aufgebaut wird (Gibson et al. 2010, Gebhardt 2012). Bevor ein Produkt dreidimensional additiv gefertigt werden kann, muss zunächst ein Datensatz vorhanden sein. Dabei handelt es sich in der Regel um *Standard Tessellation Language* Dateien (STL-Dateien). Diese können mit Hilfe von CAD Programmen erzeugt werden oder aus bildgebenden Verfahren wie beispielsweise der Computertomographie oder der Röntgenspektroskopie gewonnen werden. STL-Dateien beinhalten die Beschreibung der Oberfläche eines Bauteils mit Hilfe von Dreiecksfacetten. Nach dem Übertragen der Datei auf eine Maschine zur additiven Fertigung, kann das Modell virtuell bezüglich Größe, Anzahl, Ausrichtung und Position modifiziert werden (Srivatsan et al. 2015). Anschließend können spezifische Verfahrensparameter bestimmt werden. Dazu können je nach Verfahren die Schichtdicke, Temperaturprofile, Verfahrensgeschwindigkeiten oder Beleuchtungsdauern gehören (Srivatsan et al. 2015). Im nächsten Schritt, dem sogenannten „Slicing“ wird das virtuelle Bauteil in die gewünschten Schichtdicken geschnitten, bevor das additive Fertigungsverfahren gestartet werden kann (Ligon et al. 2017). Der dreidimensionale Aufbau erfolgt jeweils nach dem gleichen Grundprinzip. Die virtuell erstellte Schicht wird durch den 3D-Drucker materiell erstellt, wobei der Umformvorgang in der x-y-Ebene erfolgt. Im Anschluss verfährt der 3D-Drucker um eine Schichtdicke in der z-Ebene und wiederholt den Vorgang, wobei die neu entstandene Schicht mit der vorherigen in der z-Richtung verbunden wird (Ligon et al. 2017). Diese Schritte werden solange wiederholt, bis das Bauteil komplett generiert wurde.

3.4.1 Verfahren der additiven Fertigung und Anwendung in der Medizintechnik

Im Jahr 2009 definierte das ASTM International Committee F42 on Additive Manufacturing Technology verschiedene Begriffe, um die unterschiedlichen Verfahren der additiven Fertigung zu klassifizieren. Diese sollen in diesem Kapitel vorgestellt werden, außerdem soll auf die im jeweiligen Verfahren einsetzbaren Werkstoffe eingegangen werden.

Material Extrusion (ME)

Das Grundprinzip der Material Extrusion basiert auf dem Prinzip durch eine Düse selektiv Material auszutragen. Zu dieser Kategorie gehört das weitverbreitete Fused Filament Fabriaction (FFF), auch Fused Deposition Modeling (FDM) genannt. Das Verfahren wurde 1989 von S. Scott Crump im Rahmen einer Patentanmeldung beschrieben. 1992 wurde das Patent erteilt (Crump 1992).

Als Ausgangswerkstoff wird beim FFF-Verfahren in der Regel ein sogenanntes Filament (Kunststoffstrang) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Kunststoffstrang mit einem definierten Durchmesser von 1,75 mm. Es existieren auch Systeme, die Kunststoffstränge mit einem anderen Durchmesser verwenden. Das Filament wird über einen Extruder (in der Regel zwei Reibräder, zwischen denen das Filament läuft) in eine beheizte Düse, dem sogenannten Hotend geschoben. In diesem wird der Kunststoff aufgeschmolzen und strangförmig auf eine Bauplatzform aufgetragen. Durch das mechanische Zusammenspiel von Druckkopf und Bauplatzform lässt sich dreidimensional im Raum verfahren. (Crump 1992)

Schichtdicken im FFF-Verfahren betragen in der Regel zwischen 100 µm und 200 µm. Die Düsen zum Austragen des Materials haben einen standardmäßigen Innendurchmesser von aktuell 200 µm oder 400 µm. Je geringer die Schichtdicke und je kleiner die Düse desto besser ist die Auflösung des gedruckten Bauteils. Mittels FFF-Verfahren lassen sich Genauigkeiten von ca. 200 µm realisieren.

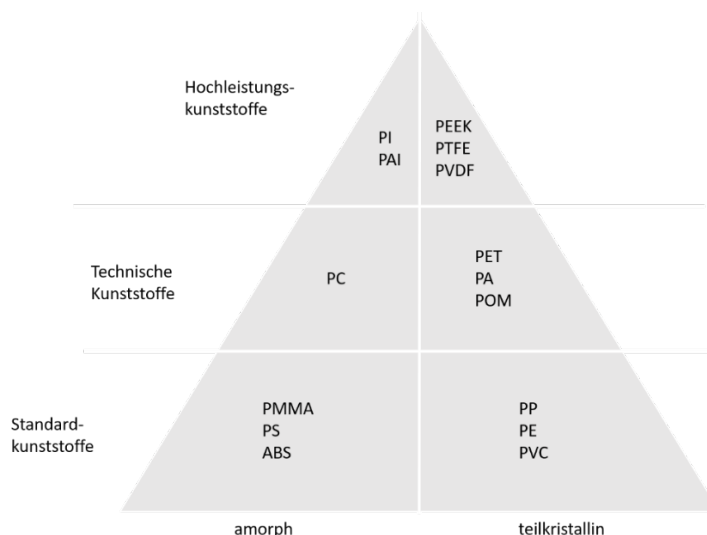


Abbildung 9: Einordnung von thermoplastischen Werkstoffen in Standardkunststoffe, technische Kunststoffe sowie Hochleistungskunststoffe mit PP = Polypropylen, PE = Polyethylen, PVC = Polyvinylchlorid, PMMA = Polymethylmethacrylat, PS = Polystyrol, ABS = Acrylnitril-Butadien-Styrol, PC = Polycarbonat, PET = Polyethylenterephthalat, PA = Polyamid, POM = Polyoxymethylen, PVDF = Polyvinylidenfluorid, PTFE = Polytetrafluorethylen, PI = Polyimide, PAI = Polyamidimid, PEEK = Polyetheretherketon

Mittels FFF-Verfahren lassen sich nahezu alle thermoplastischen Werkstoffe verarbeiten. Thermoplastische Werkstoffe zeichnen sich dadurch aus, dass sie wiederaufschmelzbar sind und bereits eine breite Anwendung im Spritzgießen und Fräsen finden. Abbildung 9 zeigt eine Einordnung thermoplastischer Werkstoffe in Standardkunststoffe, technische Kunststoffe sowie Hochleistungskunststoffe.

Weiterhin ist in der Einordnung zwischen amorphen und teilkristallinen Werkstoffen zu unterscheiden. Amorphe Kunststoffe weisen eine ungeordnete Molekülstruktur auf, während teilkristalline Werkstoffe neben amorphen Bereichen auch geordnete Bereiche mit Kristallstrukturen aufweisen (vgl. Abbildung 10).

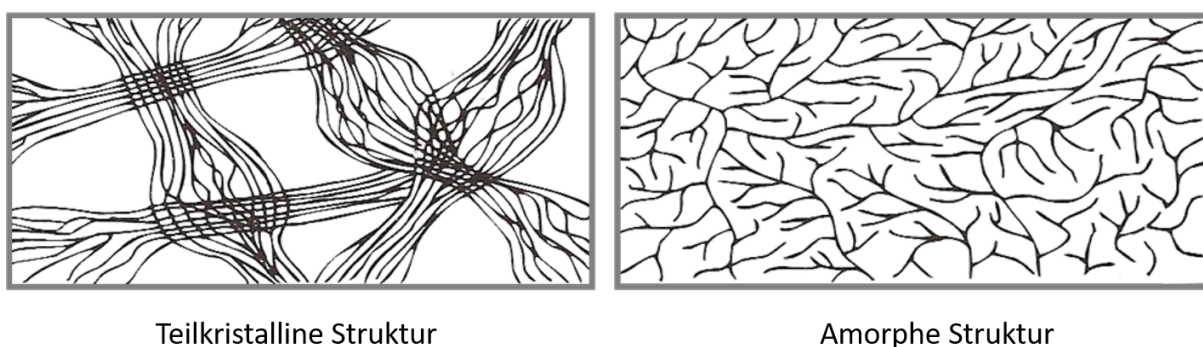


Abbildung 10: Kristallstruktur in teilkristallinen Werkstoffen (linke Seite) und amorphen Kunststoffen (rechte Seite).

An kristallinen Strukturen kommt es zu Lichtbrechungen, weshalb teilkristalline Werkstoffe in der Regel keine Transparenz aufweisen. Amorphe Kunststoffe sind hingegen in der Regel transparent.

Auf Grund des schichtweisen Aufbaues eines Bauteils während des Prozesses ist es mit aktuellem Stand der Technik nicht möglich, transparente Bauteile mittels FFF-Verfahren zu fertigen. An den Grenzflächen der einzelnen Schichten sowie einzelnen Strängen kommt es zu Lichtbrechungen, die transparente Eigenschaften verhindern.

Das FFF-Verfahren spielt in letzter Zeit eine immer größere Rolle in der Medizintechnik. Die Firma Stratasys bietet für das FFF-Verfahren den Werkstoff Acrylnitril-Butadien-Styrol (*ABS-M30i*) mit einer USP Class VI Zulassung an. Der Werkstoff kann mittels Gammastrahlung oder Ethylenoxid sterilisiert werden und ist für die Herstellung von Operationsmodellen oder Medizinprodukten mit Hautkontakt geeignet (Stratasys 2014). Weiterhin sind von der Firma Solvay PEEK und PPSU als Filament zu erhalten mit einer Zulassung für Gewebekontakt von bis zu 24 Stunden. Die Firma Evonik bietet für das FFF-Verfahren ein zugelassenes PEEK-Filament für Langzeitimplantate an. Somit eignet sich das Verfahren zur Herstellung individualisierter Implantate wie beispielsweise patientenspezifischer Schädelimplantate (vgl. Abbildung 11).



Abbildung 11: Gedrucktes Cranial-Implantat aus dem Hochleistungskunststoff PEEK basierend auf einem CT-Datensatz. Zur Verfügung gestellt von der Firma Kumovis GmbH.

Aktuelle 3D-Drucker, welche nach dem FFF-Verfahren arbeiten, erreichen eine absolute Genauigkeit von ca. 200 μm . Die minimal erreichbare Schichtdicke liegt ca. bei 80 μm . Die minimalen Wandstärken, die mit diesem Verfahren gedruckt werden können, liegen ca. bei 0,8 mm. Vertikal verlaufende Kanäle mit einem Durchmesser kleiner als 2 mm sind nicht reproduzierbar realisierbar. Horizontal verlaufende Kanalstruktur sind sehr schwer darstellbar, da diese in der Regel mit Stützmaterial gedruckt werden müssen. Biokompatible Stützmaterialien sind aktuell nicht auf dem Markt verfügbar, weshalb horizontale Kanalstrukturen diese Technologie an seine Grenze bringen.

Material Jetting (MJ)

Das Material Jetting basiert auf der Abgabe von Werkstoff in Tröpfchenform. Im Jahr 1989 wurde von Richard Helinski das Material Jetting-Verfahren erstmalig im Rahmen eines Patents beschrieben, welches 1992 erteilt wurde (Helinski 1992).

Beim Material Jetting wird über einen Druckkopf, ähnlich wie beim Tintenstrahldruck, tröpfchenweise ein Werkstoff auf eine Bauplattform aufgetragen. In der Regel werden zwei verschiedene Werkstoffe parallel verarbeitet. Ein Werkstoff baut das Bauteil auf, während der andere Werkstoff als Stützstruktur dient. In die Kategorie Material Jetting fallen das Multijet-Modelling (MJM) der Firma 3D-Systems sowie die Polyjet-Technologie (PJ) der Firma Stratasys. Beide Verfahren verwenden Photopolymere, die nach dem Auftragen auf die Bauplattform bzw. die im vorherigen Schritt gefertigte Schicht mittels UV-Licht ausgehärtet

werden. Die Ausgangswerkstoffe befinden sich in Kartuschen und werden auf eine definierte Temperatur (in der Regel ca. 60 °C) geheizt, um eine Viskosität zu erreichen, die zum Austragen aus dem Druckkopf geeignet ist. Während des Flugs des Tröpfchens auf die Bauplattform bzw. die im vorherigen Schritt gefertigte Schicht, kühlt das Material ab und wird formstabil. Die finale Festigkeit wird erst durch die UV-Behandlung erreicht. (Vaezi et al. 2013)

Für den Einsatz in der Medizintechnik sind aktuell die Werkstoffe *MED 610*, *MED 620* von der Firma Stratasys sowie der Werkstoff *VisiJet M3* der Firma 3D-Systems kommerziell erhältlich. Diese Werkstoffe haben eine USP Class VI Zulassung und können bis zu 30 Tagen im Hautkontakt oder 24 Stunden im Schleimhautkontakt eingesetzt werden. Sie finden aktuell überwiegend Einsatz in der Dentalbranche zur Herstellung von Bisschienen, Bohrschablonen oder Schnittschablonen.

Das Material Jetting-Verfahren gilt als eines der additiven Fertigungsverfahren mit der höchsten Genauigkeit und Auflösung. Es sind minimale Schichtdicken von 16 µm realisierbar, während die absolute Genauigkeit bei ca. 50 µm liegt. Kanalsysteme werden während der Datenvorbereitung automatisiert mit Stützmaterial, welches sich in warmem Öl lösen lässt, aufgefüllt. Der Druck von komplexen Kanalsystemen stellt somit kein Problem dar.

Im Jahr 2013 präsentierte die Firma Arburg, welche hauptsächlich im Spritzgießen tätig ist, das sogenannte ARBURG Kunststoff-Freiformen (AKF) und den 3D-Drucker *Freeformer*. Diese Technologie ist ebenfalls dem Material Jetting zuzuordnen. Der *Freeformer* basiert auf einer Technologie, die aus dem Spritzgießen bekannt ist. Eine Schnecke schmilzt thermoplastisches Kunststoffgranulat auf und über einen Druckkopf wird die Schmelze mit Hilfe eines Piezoaktors tröpfchenweise ausgetragen. Die Technologie ist in der Theorie in der Lage sämtliche thermoplastischen Kunststoffe zu verarbeiten. Stabil können jedoch aktuell noch keine Hochleistungskunststoffe verarbeitet werden. Für die Medizintechnik werden somit lediglich resorbierbare Werkstoffe verarbeitet, die jedoch nicht für die Fertigung von Bioreaktoren in Frage kommen.

Binder Jetting (BJ)

Das Binder Jetting wurde erstmal im Jahr 1989 von Emanuel Sachs in Zusammenarbeit mit dem Massachusetts Institute of Technology im Rahmen eines Patents beschrieben, welches im Jahr 1993 erteilt wurde (Sachs et al. 1993).

Beim Binder Jetting wird ein dreidimensionales Bauteil gefertigt, indem im ersten Schritt eine Schicht Pulver auf eine Bauplattform aufgetragen wird. Im Anschluss wird auf die Pulverschicht selektiv ein flüssiger Haftvermittler in Tröpfchenform über einen Druckkopf aufgetragen. Die Bereiche, welche mit dem Haftvermittler benetzt wurden, verbinden sich lokal und bilden somit das zu druckende Bauteil. (Sachs et al. 1993)

Die Firma Voxeljet ermöglicht mit dieser Technologie die Verarbeitung von Polymethylmethacrylat sowie von Sand (Herstellung von Gussformen). Die Fusion Jet 3D-Drucker der Firma HP nutzen einen dem Binder Jetting nachgeschalteten thermischen Prozess, um die mit Haftvermittler bedruckten Pulverbereiche lokal zu verschmelzen. HP ermöglicht auf die Weise die Verarbeitung von Polyamid 11 und Polyamid 12.

Aktuell können in diesem Verfahren keine biokompatiblen Hochleistungskunststoffe verarbeitet werden. In der Medizintechnik wird dieses Verfahren eingesetzt, um beispielsweise Schnittschablonen, Orthesen oder Prothesen aus Polyamid zu fertigen.

Mit dem Binder Jetting lassen sich minimale Schichtdicken von 50 µm sowie eine absolute Genauigkeit von ca. 100 µm realisieren. Es wird keine Stützmaterial benötigt, da das umliegende Pulver, welches nicht zum Bauteil, gehört, diese Funktion übernimmt. Das Drucken von komplexen Kanalstrukturen ist somit möglich. Bei sehr kleinen Kanalstrukturen von geringeren Durchmessern als 1 mm kann es jedoch zu Problemen bei der Entfernung des eingeschlossenen Restpulvers kommen.

Powder Bed Fusion (PBF)

Das Powder Bed Fusion-Verfahren wurden erstmal 1986 von Carl Deckard im Rahmen eines Patents beschrieben, das von der University of Texas System angemeldet wurde und 1989 erteilt wurde (Deckard 1989). Mittels Powder Bed Fusion können sowohl Metalle als auch Kunststoffe verarbeitet werden. Im Kunststoffbereich wird das Verfahren Selektives Lasersintern genannt (SLS).

Beim SLS-Verfahren wird in einem ersten Schritt Kunststoff in Pulverform, mit einer Korngröße zwischen 20 µm bis 80 µm auf eine Bauplattform aufgebracht. Der gesamte Bauraum ist in der Regel auf eine Temperatur knapp unterhalb der Schmelztemperatur des Kunststoffes aufgeheizt. Mit Hilfe eines Lasers wird die jeweilige Schicht abgescannt, sodass diese Bereiche lokal verschmelzen. Im Anschluss wird die nächste Schicht Pulver aufgebracht und der Prozess beginnt erneut. (Deckard 1989)

Aktuelle Systeme verwenden bis zu vier CO₂-Laser, um die Produktivität der 3D-Drucker zu erhöhen. Die Firma EOS kündigte ein neuartiges System an, das anstelle von CO₂-Lasern Diodenlaser verwendet. So sollen bis zu eine Million Laser verwendet werden können, um eine gesamte Schicht in einem Schritt zu belichten. Mit einer Markteinführung wird jedoch nicht vor 2023 gerechnet.

Im SLS-Verfahren werden überwiegend Polyamid-Werkstoffe verarbeitet. So sind aktuell bereits patientenindividuelle Schnitt- und Bohrschablonen kommerziell erwerblich (Dawood et al. 2015). Spezielle SLS-Anlagen der Firma EOS sind in der Lage den biokompatiblen Hochleistungswerkstoff PEEK zu verarbeiten (Berretta et al. 2015). Die Firma Oxford Performance Materials erhielt im Jahr 2013 die 510(k)-Freigabe der FDA für das

Inverkehrbringen von Schädelprothesen gefertigt aus PEEK auf einer EOS P-800 SLS Maschine . Ein großer Nachteil der Verarbeitung von Hochleistungskunststoffen im SLS-Verfahren ist die Veränderung der mechanischen Eigenschaften gegenüber den Kennwerten, welche aus dem Spritzgießen bzw. dem Fräsen bekannt sind. PEEK ist in der Regel kein spröder Werkstoff und weist eine mögliche Dehnung von bis zu 70 % auf. Im SLS-Verfahren verarbeitet PEEK weist lediglich Dehnwerte von ca. 3 % auf, was zu einem spröden Materialverhalten führt. Dies ist auf die dauerhaft hohen Umgebungstemperaturen knapp unterhalb des Schmelzpunktes während des Prozesses zurückzuführen, die zu einer Degradation des Werkstoffes und somit zu einer Versprödung führen.

Im SLS-Verfahren lassen sich minimale Schichtdicken von 50 µm und eine absolute Genauigkeit von 100 µm realisieren. Die Oberfläche ist auf Grund des Zusammenschmelzens einzelner Pulverkörner porös und rau. Aktuell sind keine transparenten Werkstoffe für das SLS-Verfahren kommerziell erwerblich.

Vat Photopolymerization (VP)

Vat Photopolymerization gilt als das älteste 3D-Druck Verfahren. Chuck Hull beschrieb es im Jahr 1984 im Rahmen eines Patents welches 1986 erteilt wurde (Hull 1986). Chuck Hull beschrieb ein Verfahren, in welchem auf eine Bauplatzform ein Photopolymer (vgl. Kapitel 3.4.2) aufgetragen wurde, das anschließend lokal mit einem UV-Laser vernetzt wird. Dieses Verfahren nannte er Stereolithografie (SLA).

Zur Kategorie Vat Photopolymerization gehören ebenfalls die Verfahren 2-Photonen-Stereolithografie (2PP) sowie das Digital Light Processing (DLP). Im 2PP-Verfahren werden Lichtquellen genutzt, um zwei Photonen sich in einem spezifischen Punkt innerhalb eines Photopolymers treffen zu lassen. An diesem Punkt erreicht die Energie durch das Zusammentreffen der beiden Photonen einen Wert, der ausreicht, um den Werkstoff lokal zu vernetzen. So lassen sich mittels 2PP Bauteile im Mikrometerbereich additiv fertigen. Dieses Verfahren ist jedoch sehr teuer und wird aktuell nur im Rahmen von Forschungsprojekten eingesetzt.

Das Digital Light Processing (DLP) gilt allgemein als Weiterentwicklung des SLA-Verfahrens. Beim DLP-Verfahren befindet sich flüssiges Photopolymer in einem Werkstoffbehälter, dem sog. Vat, mit einem für UV-Strahlung durchlässigen Boden. Eine UV-LED-Lichtquelle wird dazu verwendet, um eine komplette Schicht in einem Schritt zu bestrahlen und so die Polymerisation zu starten (Gibson et al. 2010, Gebhardt 2012).

Die selektive Bestrahlung erfolgt in Form von Schwarz-Weiß-Bildern und geschieht über einen Digital Micromirror Device Chip (DMD-Chip), wie er auch in herkömmlichen Video-Beamern zu finden ist (Sun et al. 2005, Ligon et al. 2017). Dieser besteht aus einem Array einzelner kippbarer Mikrospeigeln, die einfallendes Licht entweder auf einen Absorber oder über eine

Linse auf den Vatboden, in welchem sich das Photopolymer befindet, projizieren (vgl. Abbildung 12).

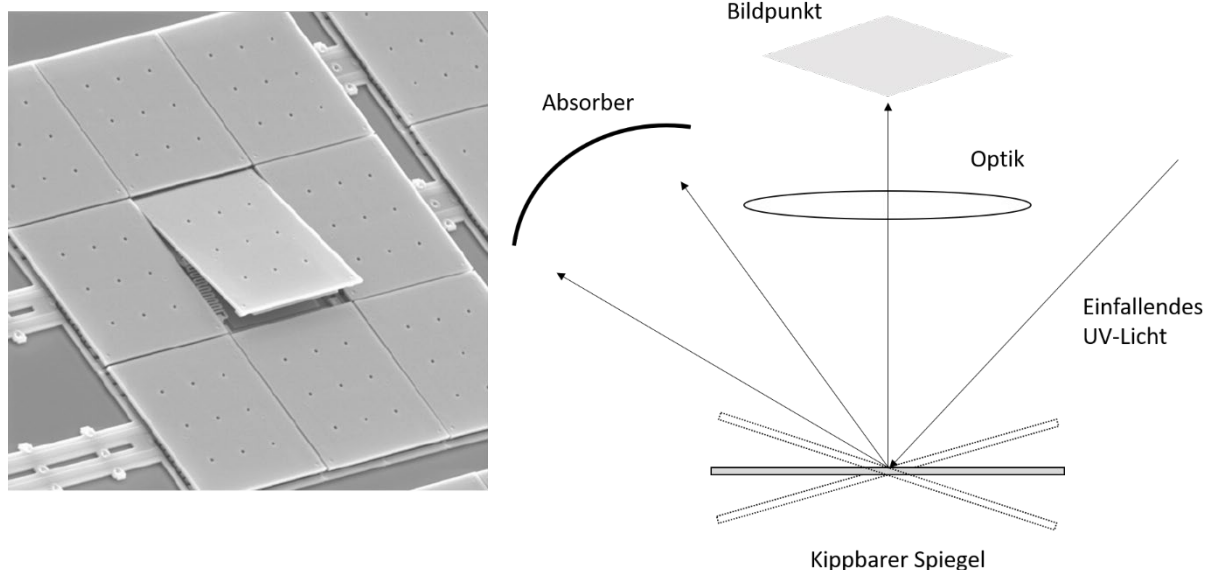


Abbildung 12: Rasterelektronen-Mikroskop Aufnahme (linkes Bild) eines 3x3 DMD-Chips (Walraven 2003). Eigene Darstellung eines einzelnen kippbaren Microspiegels (rechtes Bild), der je nach Kippwinkel einen Bildpunkt abbildet oder das einfallende UV-Licht auf einen Absorber lenkt.

Auf dem linken Teil der Abbildung 12 ist eine Rasterelektronen-Mikroskop Aufnahme zu sehen, die einen 3x3 DMD-Chip zeigt. Der mittlere Spiegel befindet sich in einem gekippten Zustand. Das Kippen der Spiegel wird dazu verwendet, um einen Bildpunkt auf dem Vat zu erzeugen oder das einfallende UV-Licht, welches zum Starten der Vernetzungsreaktion des Photopolymers benötigt wird, auf einen Absorber zu leiten. So kann jeder Spiegel in einen „On“- (Licht erzeugt einen Bildpunkt) oder einen „OFF“- (Licht wird auf den Absorber geleitet) Zustand geschaltet werden.

Die Anzahl der Mikrospiegel auf dem DMD-Chip ist ausschlaggebend für die Auflösung der DLP-3D-Drucker. Die neuesten Modelle arbeiten mit Chips mit bis zu 4 Millionen Mikrospiegeln. Je nach Abstand zum DMD-Chip können somit Bildpunkte mit Kantenlängen von unter 20 μm auf dem Vat erzeugt werden. Weiterhin können mit dem DLP-Verfahren minimale Schichtdicken von 20 μm realisiert werden, was das Verfahren zu einem der genauesten 3D-Druck-Verfahren macht.

Ähnlich wie bei den MJ-Verfahren erreichen Bauteile aus Photopolymeren während des Drucks im DLP-Verfahren nicht ihre vollständige Festigkeit. Diese wird erst in einem zweiten Prozess, dem Beleuchten in einer UV-Kammer erreicht. Auf Photopolymere im Allgemeinen wird im Folgenden detaillierter eingegangen.

Das DLP-Verfahren sowie das SLA-Verfahren werden bereits vielfählig im Bereich der Dentalbranche sowie der Hörgerätebranche eingesetzt (Van Noort 2012). 99 % aller patientenindividuellen Hörgeräte sowie bis zu 50.000 Zahnspangen pro Tag werden mittels additiver Fertigung hergestellt (Banks 2013, Lipson 2013, Ventola 2014). Hierfür stehen eine Vielzahl von Klasse IIa zugelassenen Photopolymeren zur Verfügung.

3.4.2 Photopolymere

In diesem Kapitel sollen die Grundlagen zu Photopolymeren aufgezeigt werden. Dabei stehen vor allem die einzelnen Bestandteile von Photopolymeren im Vordergrund sowie die Vernetzungsreaktionen, die aus dem flüssigem Photopolymer einen Festkörper während des 3D-Druckens werden lassen.

Grundsätzlich bestehen Photopolymer-Systeme in der Regel aus mehreren Bestandteilen (Gibson et al. 2010, Bagheri et al. 2019):

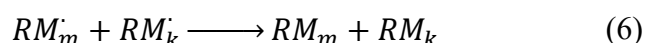
- Grundmonomere: Langkettige Moleküle, die v.a. die mechanischen Eigenschaften des ausgehärteten Bauteiles beeinflussen.
- Photoinitiatoren: Moleküle, die bei Eintrag energiereicher Strahlung Radikale bilden, um so die Vernetzungsreaktionen zu starten.
- Additive: Beispielsweise UV-Stabilisatoren, die die Vernetzungsreaktionen beeinflussen (Einstellung der Durchhärtetiefe) sowie ungewünschte Vernetzungsreaktionen minimieren.

Die Basis des Photopolymers bilden die Monomere, bzw. Oligomere. Hierbei handelt es sich um Moleküle in flüssigem Zustand, welche durch Energieeintrag einer spezifischen Wellenlänge ausgehend von einer Lichtquelle, ausgehärtet werden können und somit in einen festen Zustand übergehen (Bagheri et al. 2019). Photoinitiatoren sind Moleküle, die in der Regel einen hohen Absorptionskoeffizient aufweisen und die Aufgabe haben, in Folge von energiereicher Strahlung reaktive Radikale oder Kationen zu bilden, welche Vernetzungsreaktionen starten (Bagheri et al. 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Photopolymer-System verwendet, welches eine radikalische Polymerisationsreaktion aufweist, weshalb auf diese Art der Vernetzung im Folgendem detaillierter eingegangen wird. Neben den Grundmonomeren und Photoinitiatoren können Photopolymer-Systeme zusätzlich mit Additiven wie beispielsweise UV-Stabilisatoren modifiziert werden. Diese Additive haben in der Regel das Ziel, die Druckqualität zu verbessern bzw. eine höhere Prozesskontrolle zu gewährleisten, da sich die Vernetzungsreaktionen durch gezieltes Absorbieren von energiereicher Strahlung steuern lassen können (Kowsari et al. 2018).

In Kapitel 5.2 wird auf die genaue Zusammensetzung des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Photopolymers eingegangen und aufgezeigt, wieso die jeweiligen Arten von Photoinitiatoren und insbesondere Monomeren verwendet wurden.

Radikalische Polymerisationsreaktionen

Die in dieser Arbeit verwendeten Photopolymere vernetzen über eine radikalische Polymerisation. Diese kann in drei Phasen unterteilt werden: Initiierungsreaktion, Wachstumsreaktion und Kettenabbruchsreaktion (vgl. Formel 3-6) (Gibson et al. 2010).



mit: PI ist Photoinitiator, $h\nu$ ist energiereiche UV-Strahlung, R^{\cdot} ist reaktives Radikal, R ist abreagiertes Radikal und M ist Monomer.

Zu Beginn der Initiierungsreaktion (vgl. Formel 3) absorbiert der Photoinitiator die energiereiche UV-Strahlung und zerfällt in reaktive Radikale. Diese Radikale starten zusammen mit Monomeren die Photopolymerisation und bilden eine reaktive Radikal-Monomer-Kette. In der Wachstumsreaktion (vgl. Formel 4) reagiert diese mit weiteren Monomeren und wächst somit zu einer immer länger werdenden reaktiven Radikal-Polymer-Kette. Abschließende Abbruchreaktionen (vgl. Formel 5 und 6) beenden den Polymerisationsprozess. Dies geschieht indem sich zwei Radikale gegenseitig eliminieren. Dabei können eine lange Polymerkette oder zwei kürzere Polymerketten entstehen. Die kationische Polymerisation ähnelt der radikalischen Reaktion. Hier führen Katalysatoren zur Bildung von Protonen die als Initiatoren der Polymerisation fungieren.

Sauerstoff-Inhibition

Abschließend in diesem Kapitel wird noch auf eine Besonderheit bei der Verarbeitung von Photopolymeren eingegangen, die sogenannte Sauerstoff-Inhibition. Für radikalische Polymerisationsreaktionen wirkt Sauerstoff inhibierend (Shawkat et al. 2009). Sauerstoffmoleküle reagieren mit gebildeten Radikalen und verlangsamen oder stoppen so die Polymerisation. Somit bildet sich auf der Oberfläche des auszuhärtenden Objektes eine

sogenannte Sauerstoff-Inhibitionsschicht, welche mehrere Mikrometer Dicke betragen kann (Rueggeberg et al. 1990, Finger et al. 1996, Shawkat et al. 2009). Diese Schicht besteht dementsprechend aus nicht komplett vernetztem Photopolymer.

3.4.3 Anisotropie in der additiven Fertigung

Vergleicht man mechanische Eigenschaften 3D-gedruckter Bauteile mit Bauteilen hergestellt in konventionellen Fertigungsverfahren wie dem Spritzgießen oder dem Fräsen ist zu erkennen, dass 3D-gedruckte Bauteile oftmals anisotrope Eigenschaften aufweisen. Anisotropie bezeichnet die Richtungsabhängigkeit einer Eigenschaft. Das bedeutet die mechanischen Kennwerte eines Bauteils können variieren in Abhängigkeit der Richtung, in der sie gedruckt werden. Abbildung 13 zeigt drei unterschiedliche Orientierungen von Zugprüfkörpern:

- XY-Orientierung: Das Bauteil wird flach auf der Bauplattform gedruckt.
- XZ-Orientierung: Das Bauteil wird auf seiner Kante gedruckt, jedoch mit einer länglichen Ausrichtung entlang der Bauplattform.
- ZX-Orientierung: Das Bauteil wird hochkant gedruckt.

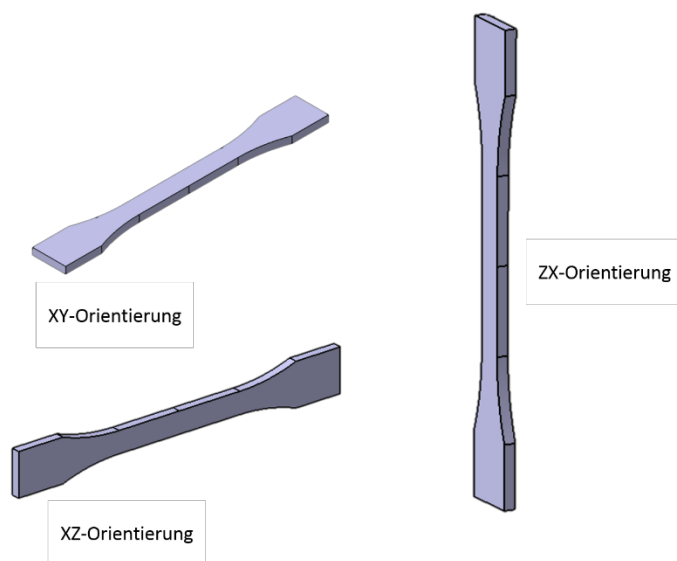


Abbildung 13: Unterschiedliche Ausrichtungen von Bauteilen für den 3D-Druckprozess.

Durch die unterschiedlichen Orientierungen ergeben sich unterschiedlich viele Schichtdicken, die gefertigt und miteinander verbunden werden müssen, um ein gleiches Produkt zu fertigen. Die Auswirkungen der Baurichtung auf die mechanischen Eigenschaften sind von Verfahren zu Verfahren unterschiedlich.

Monzón et al. untersuchten in ihrer Studie den Einfluss der Orientierung auf 3D-gedruckte Probekörper im DLP-Verfahren (Monzón et al. 2017). Dabei konnte festgestellt werden, dass

Prüfkörper, gedruckt in ZX-Orientierung, bessere mechanische Kennwerte aufweisen als Prüfkörper, die in XY-Orientierung gedruckt wurden. Sie führten diese Ergebnisse auf die Auflösung des DMD-Chips zurück. Die einzelnen Spiegel belichten eine Ebene nicht zu 100 %, da zwischen den Spiegeln kleine Bereiche sind, die keine Energie ausstrahlen und somit an diesen Stellen eine schlechtere Vernetzung bewirken. Diese minimalen unbelichteten Bereiche führen somit zu einer geringeren mechanischen Festigkeit zwischen den einzelnen Pixeln als zwischen den jeweiligen Schichten. (Monzón et al. 2017)

Shaffer et al. im Gegensatz untersuchten den Einfluss der Orientierung bei Material Extrusion-Verfahren (Shaffer et al. 2014). Sie konnten bei in XY-Orientierung gedruckten ABS-Probekörpern 31,1 MPa maximal Festigkeit messen, während bei in ZX-Orientierung gedruckten Prüfkörpern aus demselben Werkstoff lediglich 6,6 MPa gemessen wurden. Eine Wiederholung des Versuchs mit einem anderen Werkstoff (PLA) konnte das Ergebnis bestätigen. Als Grund wurde eine schlechte Verbindung zwischen den Schichten ausgemacht. Wird ein einzelner Strang abgelegt, ist die thermische Energie lange hoch genug, dass eine Quervernetzung der Polymerketten stattfindet. Wird auf eine Schicht, die bereits im festen Zustand und somit abgekühlt ist, eine neue Schicht aufgebracht reicht der Energieeintrag der neuen Schicht nicht aus, um eine Vernetzung mit der darunter liegenden Schicht zu realisieren. (Shaffer et al. 2014)

Auch in weiteren additiven Fertigungsverfahren wie dem Selektiven Lasersintern oder dem Material Jetting konnten signifikante Einflüsse der Orientierung auf die mechanischen Eigenschaften festgestellt werden (Caulfield et al. 2007, Cazón et al. 2014, Monzón et al. 2017).

3.5 Additive Fertigung und neue medizintechnische Werkstoffe am Stand der Forschung

Die additive Fertigung wird als eine disruptive Technologie für die Medizintechnikbranche angesehen. Es wird an neuen Verfahren, Verbesserungen bestehender Verfahren sowie neuen Werkstoffen für medizintechnische Anwendungen geforscht. Neben diesen technologischen Entwicklungen beschäftigt sich die Forschung ebenso mit passenden Applikationen, bei denen die additive Fertigung einen deutlichen Mehrwert mit sich bringt. In diesem Abschnitt soll auf die neuesten Entwicklungen der additiven Fertigungstechnologien, der biokompatiblen Materialentwicklungen sowie medizintechnischen Anwendungen eingegangen werden.

Die im Kapitel 3.4 vorgestellten Verfahren sind technologisch bereits auf industriellem Level. Für diese Technologien fokussiert sich die Forschung in der Regel auf die Optimierung von Geschwindigkeit, die Verbesserung der Wirtschaftlichkeit, die Vergrößerung der Bauräume oder die Verbesserung der Auflösung. Eine der neuesten Hardwareentwicklungen, die potenziell auch in der Medizintechnik eingesetzt werden kann, wurde 2020 in der Nature publiziert. Regehly et al. veröffentlichten Daten und Ergebnisse zu ihrer neuen 3D-Druck Technologie, die sie „Xolography“ nennen (Regehly et al. 2020). Es handelt sich hierbei

erstmals um volumetrisches 3D-Drucken, welches nicht nach dem Schichtbauprinzip abläuft. Die Technologie nutzt zwei Lichtquellen unterschiedlicher Wellenlänge sowie ein rotierendes Photopolymer-Reservoir. So kann ein gesamtes Objekt in das Photopolymer-Reservoir projiziert werden und physisch generiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass sich die Geschwindigkeit gegenüber herkömmlichen SLA oder DLP-Druckern um den Faktor 10-100 beschleunigen lässt. Lassen sich mit dieser Technologie in Zukunft auch biokompatible Werkstoffe verarbeiten, könnte dies eine vielversprechende Technologie für die Herstellung von diversen Medizinprodukten wie auch von Bioreaktoren sein.

Ein Großteil weiterer Hardware bezogener Forschung beschäftigt sich mit dem Thema Bioprinting. Hierbei wird Hardware entwickelt, die in der Lage ist, parallel zu der Verarbeitung biokompatibler oder biodegradierbarer Werkstoffe lebende Zellen zu verdrucken (Angelats Lobo et al. 2019). Bioprinting beschäftigt sich in der Regel mit der direkten Rekonstruktion menschlichen Gewebes (Barrs et al. 2020). Bioprinter kombinieren in der Regel unterschiedliche Technologien wie Material Jetting, Material Extrusion oder Vat Polymerisation. Verarbeitet werden sogenannte „Bioinks“, bei denen es sich meist um in Hydrogele (Gelatine, Alginate oder Cellulose) eingebettete Zellen handelt (Barrs et al. 2020). Nguyen et al. untersuchten beispielsweise die Verwendung pluripotenter Stammzellen eingebettet in ein Hydrogel zum Druck von Knorpelimitaten (Nguyen et al. 2017). Kang et al. nutzen einen Bioprinter zur Verarbeitung von PCL (Polycaprolacton), ein resorbierbarer Kunststoff, in Kombination mit humanen Fruchtwasserzellen, zur künstlichen Generierung von Knochen (Kang et al. 2016). Wie der Stand der Forschung zeigt, liegt der Fokus in diesem Forschungsbereich auf der Materialentwicklung mit dem Ziel der künstlichen Herstellung von Gewebe. Der Nutzen der additiven Fertigung zur Herstellung neuartiger Bioreaktoren zur optimierten Kultivierung der künstlichen Konstrukte wird dabei nicht untersucht.

Neben neuen 3D-Druck Technologien wird auch an neuen Materialien für bestehende additive Technologien geforscht. Vor allem auch große Rohmaterialhersteller wie Evonik, Solvay, LyondellBasell, BASF oder Victrex/Invibio sehen großes Potential für ihre Werkstoffe und investieren in die Erforschung neuer und für den 3D-Druck optimierter Werkstoffe. Vaezi et al. untersuchten in Zusammenarbeit mit Invibio die Einarbeitung von bioaktiven Materialien wie Calciumphosphat in eine PEEK Matrix, mit dem Ziel der Verbesserung der Osseointegration 3D-gedruckter Implantate (Vaezi et al. 2016). Auch Evonik hat im Jahr 2020 angekündigt, PEEK-Biomaterialien für den 3D-Druck auf den Markt zu bringen. Weiterhin beschäftigt sich die Forschung mit der Optimierung von Werkstoffen für eine bessere Verdruckbarkeit. Beispielsweise finden Polyethylen (PE) oder Polypropylen (PP) großen Einsatz in der Medizintechnik, vor allem für Probeimplantate, Gleitflächen oder Gehäusen. Auch ein Einsatz für die Herstellung von Bioreaktoren wäre denkbar. Auf Grund der hohen Anfälligkeit für Verzug eignen sich aktuelle Typen von PE oder PP nicht für den 3D-Druck. Schirmeister et al. arbeiten an einer optimierten Variante für das Material Extrusion Verfahren (Schirmeister et al. 2019). Vor allem die Reduktion der Verzugsproblematik konnte erreicht werden, was

diesen Werkstoff vielversprechend für zukünftige medizintechnische Anwendungen macht. Der Einsatz des optimierten Polymers konnte bereits für die Herstellung von Face-shields im Rahmen der Covid-19-Pandemie gezeigt werden (Burkhardt et al. 2020).

Weitere aktuelle Materialforschungen zielen auf das Verdrucken biologisch aktiver Werkstoffe wie beispielsweise Hydroxylapatit ab. Zeng et al. publizierten eine Methode, in der sie Hydroxylapatit in einem ersten Schritt in ein Photopolymer gemischt haben, welches im Anschluss mittels des DLP-Verfahrens additiv verarbeitet wurde (Zeng et al. 2018). Es konnten Füllgrade bis zu 30 % erreicht werden. Nach dem Drucken wurde in einem Sinterprozess das Photopolymer zersetzt, sodass reine Hydroxyapatit-Bauteile zurückblieben. Mit diesem Verfahren wurden Scaffolds für das Tissue Engineering untersucht. In der Studie konnte gezeigt werden, dass die erzeugten Hydroxylapatit-Scaffolds biokompatibel waren, sowie für das Anwachsen von Osteoblasten geeignet war.

Neben Hardware- und Materialinnovationen wird ebenso viel Forschung mit dem Ziel, neue Applikationen für die additive Fertigung in der Medizinbranche zu finden, betrieben. Dem Stand der Forschung nach fokussiert sich die additive Fertigung in der Medizintechnik auf folgenden fünf Applikationsbereiche (Tuomi et al. 2014, Javaid et al. 2018, Culmone et al. 2019):

- Medizinische Modelle
- Implantate
- OP-Hilfe wie Schnittschablonen und Probeimplantate
- Medizinische Hilfsmittel
- Künstliche Gewebe

Ein großer Trend aktueller Forschung ist die Untersuchung einer direkten Translation in die Klinik, sogenanntes point-of-care 3D-Drucken. Die meisten Studien haben sich hierbei im ersten Schritt auf die point-of-care Produktion von klinischen Modellen fokussiert (Diment et al. 2017, Tellisi et al. 2018). Im Bereich der Implantate stehen vor allem kostengünstige Technologien wie die Material Extrusion Technologien im Vordergrund. Das Universitätsklinikum Basel beschäftigt sich bereits seit einigen Jahren mit der potentiellen Fertigung von individualisierten PEEK-Implantaten für die Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie direkt im Klinikum (Honigmann et al. 2018, Han et al. 2019). Neueste Studien zeigen, dass die Technologien bereits so weit entwickelt sind, um passgenau individuelle Implantate innerhalb einer Toleranz von 0,5 mm am point-of-care zu fertigen ohne Hilfestellung technischer Experten (Sharma et al. 2020), oftmals jedoch noch hinsichtlich der mechanischen Festigkeiten verbesserungswürdig sind (Sharma et al. 2020).

3.6 Additive Fertigung von Bioreaktoren am Stand der Forschung

Wie bereits in vorherigen Kapiteln beschrieben, findet die additive Fertigung im Bereich der Medizintechnik bereits regen Einsatz. Vor allem für Anwendungen wie individualisierte Implantate im Schädelbereich, der Wirbelsäule, der Hüfte, dem Knie oder zur Herstellung von Probeimplantaten, Instrumenten und anatomischen Modellen ist der 3D-Druck bereits im kommerziellen Einsatz. Im Gegensatz dazu ist der Einsatz der additiven Fertigung von Bioreaktoren noch am Anfang und lediglich im Bereich der Forschung in wenigen Publikationen zu finden. Eine PubMed-Suche mit den Suchbegriffen „3d printing“ und „bioreactor“ zeigte lediglich 130 Treffer. Eine Vielzahl davon beschäftigt sich mit der Untersuchung der Fertigung von Scaffolds und nicht der Herstellung des eigentlichen Bioreaktors. Mit dieser beschäftigen sich nur wenige der gefundenen Publikationen. Dies zeigt, dass in diesem Bereich noch eine Vielzahl an Forschungsaktivitäten notwendig sind. Im Folgenden soll auf einige der gefundenen Publikationen, welche als relevant für die Arbeit eingestuft werden, eingegangen werden.

In einer Vielzahl der Publikationen wird die additive Fertigung lediglich als Hilfsmittel eingesetzt, um unkritische Komponenten, die nicht in direktem Kontakt mit Zellen oder Gewebe treten, zu fertigen. Putame et al. nutzen die FDM-Technologie zur Herstellung von Gehäuseteilen oder Probehaltern, um deren Funktionalitäten schnell zu prüfen, bevor die finalen Bauteile aus biokompatiblen und autoklavierbaren Werkstoffen spanend hergestellt werden (Putame et al. 2019). Raveling et al. fertigten aus ABS mit Hilfe der FDM-Technologie einen Bioreaktor zur Untersuchung mechanischer Kennwerte von Kollagen-Schwämmen (Raveling et al. 2018). Es wurden jedoch keine biologischen Untersuchungen durchgeführt. Janvier et al. nutzten die FDM-Technologie, um aus PLA einen Bioreaktor mit sechs unabhängigen Kammern zu fertigen, in denen künstlich hergestellte Sehnen zyklisch belastet werden können (Janvier et al. 2020). Um die 3D-gedruckten Bauteile wasserdicht und biokompatibel zu gestalten, wurden diese nach dem 3D-Druck mit Epoxidharz sowie PDMS beschichtet.

Weitere Publikationen nutzen die additive Fertigung, um die Auslegung von Bioreaktoren zu verkürzen sowie zu optimieren, jedoch ohne in Kontakt zu Zellen oder Gewebe zu kommen. Nichols et al. nutzten beispielsweise die SLA-Technologie, um einen neuartigen Bioreaktor auszulegen, in welchem ein maximierter Fluidtransport durch die Hauptkammer realisiert werden sollte (Nichols et al. 2018). So konnte ein 2,37-fach höherer Durchfluss durch die Hauptkammer realisiert werden, mit dem Ziel den Nährstofftransport zu verbessern.

Wie bereits erwähnt beschäftigen sich aktuell nur wenige Untersuchungen mit der Herstellung der eigentlichen Bioreaktoren bzw. den Kammern eines Bioreaktors, der in direktem Kontakt mit Zellen oder Gewebe steht. Gensler et al. nutzen die SLA-Technologie und den Werkstoff Dental SG der Firma Formlabs, um zu zeigen, wie ein neun-teiliger Perfusions-Bioreaktor (hergestellt mittels Fräsen) nun in drei Teilen gefertigt werden kann (Gensler et al. 2020).

Weiterhin wurde in dieser Studie die Beständigkeit gegenüber Heißdampfsterilisation untersucht. Die SLA-gedruckten Bauteile zeigten einen Rückgang von 30,7 MPa auf 14,0 MPa der Festigkeit nach dem Sterilisieren. In biologischen Untersuchungen wurde der Bioreaktor mit einem Kollagenhydrogel befüllt und polymerisiert. So wurde eine kanalähnliche Struktur durch das Hydrogel erstellt, welche mit Zellen besiedelt werden konnte. Mit Hilfe eines MTT-Assays konnten vitale Zellen in dem Kollagenhydrogel nach 14 Tagen nachgewiesen werden.

Smith et al. stellten 2018 ihre 3D-gedruckte Bioreaktorplattform FBRICA vor (Smith et al. 2018). Bei FABRICA handelt es sich um einen Perfusionsreaktor mit einer integrierten Kamera sowie integrierten Kanalan Mikronadeln zur Halterung von biologischen Konstrukten. Zur Herstellung des Bioreaktors wurde die SLA-Technologie sowie erneut der Werkstoff Dental SG der Firma Formlabs verwendet. Die Kanalan Mikronadeln wurden mit Zellsphäroiden (Kombination aus porciden Fibroblasten und Leberzellen) beladen. Zusammen mit einer externen Pumpe wurde der gesamte Aufbau in einen Inkubator gestellt, um Perfusionstests durchzuführen. Nach einer Woche im Inkubator konnten mehr vitale Zellen in den dynamisch kultivierten Zellsphäroiden beobachtet werden, im Vergleich zu statisch kultivierten.

Wie dem Stand der Forschung zu entnehmen ist, ist der Einsatz von 3D-gedruckten Bioreaktoren, die im direkten Kontakt mit Zellen oder Gewebe stehen, immer noch sehr gering. In den gefundenen Publikationen wurde hauptsächlich die SLA-Technologie in Kombination mit dem Werkstoff Dental SG gefunden. In einer Vielzahl von Studien wurde dieser Werkstoff, wie auch weitere Photopolymere, jedoch als nicht biokompatibel eingestuft. Auf diese Thematik wird im folgenden Kapitel eingegangen.

3.7 Kritik am Stand der Technik

Kommerziell erwerbliche Standard-Bioreaktoren sind auf Grund der spezifischen Anforderungen unterschiedlicher Gewebe oft nicht geeignet für die Kultivierung oder das Züchten von 3D-Gewebeersatz. Neuartige Kultivierungsansätze inklusive spezialisierter Bioreaktordesigns sind in Zukunft erforderlich, um optimale Bedingungen für die Gewebszüchtung oder -kultivierung *in-vitro* zu gewährleisten und TEPs in den Patienten zu überführen (Fisher 2013, Lanza et al. 2014, Van Blitterswijk et al. 2014).

Aktuelle, in der Forschung eingesetzte, spezialisierte Bioreaktoren sind in der Regel Laboreigenbauten, bestehend aus vielen Einzelkomponenten. Diese spezialisierten Bioreaktoren werden aktuell mit konventionellen Herstellungsverfahren wie beispielsweise Fräsen, Drehen oder Spritzgießen hergestellt. Konventionelle Herstellungsverfahren sind jedoch hinsichtlich ihrer Designfreiheit stark eingeschränkt. So können beispielsweise komplexe Kanalstrukturen, Freiformflächen oder Hinterschnitte gar nicht oder nur mit sehr großem Aufwand gefertigt werden. Funktionsintegrationselemente wie Luer-Lock-Anschlüsse, transparente Fenster oder Sensorikeinheiten müssen manuell an- oder eingebracht werden.

Spezialisierte Bioreaktoren bestehen hier aktuell aus einer Vielzahl von Einzelelementen. Vor dem Einsatz müssen diese in der Regel händisch zusammengesetzt werden, was eine Erhöhung potenzieller Zusammenbaufehler sowie das Einbringen von Kontaminationen nach sich ziehen kann.

Durch die Limitationen konventioneller Fertigungsverfahren wie dem Fräsen oder dem Spritzgießen ist eine Skalierbarkeit der Fertigung spezialisierter Bioreaktoren nahezu nicht möglich. Daher gelingt der Transfer aus dem Labor an den Patienten nur selten. Es werden neue Fertigungsverfahren benötigt, die aus Produktionssicht eine Translation an den Patienten ermöglichen.

Die additive Fertigung kann auf Grund der hohen Designfreiheit die Fertigung spezialisierter Bioreaktoren in höheren Stückzahlen wirtschaftlich sinnvoll ermöglichen. Der Stand der Technik zeigt, dass der Einsatz von additiv gefertigten Bioreaktoren als sinnvoll zu sehen ist, und Teil aktueller Forschungen ist. Limitierend ist aktuell jedoch die Auswahl an biokompatiblen Werkstoffen. Um die additive Fertigung erfolgreich im Bereich des Tissue Engineerings einzusetzen, werden Prozesse sowie Materialien benötigt, die eine Biokompatibilität des Endproduktes im Einsatz und Kontakt mit biologischem Gewebe von mehreren Wochen bis zu Monaten gewährleisten (Ngan et al. 2019). Aktuell fehlen jedoch zugelassene Werkstoffe, deren Wechselwirkungen im Langzeitkontakt mit biologischem Gewebe umfangreich erforscht wurden (Ngan et al. 2019).

Schmelzer et al. untersuchten in ihrer Studie die Wechselwirkung von 3D-gedruckten Probekörpern aus ABS und PC, hergestellt im Material Extrusion-Verfahren, sowie aus *MED 610*, hergestellt im Material Jetting-Verfahren, mit humanen mesenchymalen Stammzellen. ABS und PC werden bereits im Spritzgießen für die Medizintechnik eingesetzt. Der Werkstoff *MED 610* wird von Firma Stratasys mit einer USP Class VI Zulassung als biokompatibel beworben. Es wurde jedoch beobachtet, dass alle Werkstoffe signifikant die Vitalität der Stammzellen gegenüber einer Negativkontrolle reduzieren (Schmelzer et al. 2016).

Kurzmann et al. untersuchten in ihrer Studie unterschiedliche Materialien für das SLA-Verfahren. Dabei wurden die Wechselwirkungen der Werkstoffe *Clear* und *Dental SG* der Firma Formlabs mit humanen Epithelzellen sowie Maus-Fibroblasten untersucht. Bei beiden Werkstoffen konnte eine signifikante Reduktion der Zellvitalität beobachtet werden. Weiterhin wurde beobachtet, dass auch Prozessschritte wie das Reinigen und Aushärten der Werkstoffe einen großen Einfluss auf die Biokompatibilität haben (Kurzmann et al. 2017).

Zhu et al. untersuchten in ihrer Studie die Werkstoffe ABS und PLA für das Material Extrusion-Verfahren, den Werkstoff *Visijet Crystal* der Firma 3D-Systems für das Material Jetting sowie die Werkstoffe *Watershed 11122XC* der Firma DSM Somos und *Dreve Fototec 7150 Clear* der Firma Dreve Otoplastik als lichtaushärtende Photopolymere, welche von den Herstellern als geeignet für die Herstellung von Medizinprodukten mit einer USP Class VI Zulassung

vertrieben werden. Die Studie beobachtet die Toxizität dieser Werkstoffe in fünf verschiedenen Test Methoden:

- OECD 201 Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test
- ASTM E1440–91 Acute Toxicity Test with the Rotifer Brachionus
- OECD 202 Daphnia sp. Acute Immobilisation Test
- USEPA Ceriodaphnia sp. Acute Toxicity Test
- OECD 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Assay with Daniorerio

Die Untersuchungen zeigten, dass es vor allem bei den Photopolymeren zu einem Herauslösen von Substanzen kommt, die auf die biologischen Systeme toxisch wirken. Somit wurden diese Werkstoffe als nicht sicher für den Einsatz zur Herstellung von Medizinprodukten eingestuft (Zhu et al. 2015). Macdonald et al. kamen bei ihren Untersuchungen derselben Photopolymere hinsichtlich ihrer toxischen Wirkungen auf Zebrafisch-Embryonen auf die gleichen Ergebnisse (Macdonald et al. 2016).

Piironen et al. untersuchten vier verschiedene Typen von Photopolymeren, da ein großes Potential im Einsatz des 3D-Drucks für Zellkultursysteme sowie Mikrofluidik-Systeme gesehen wird (Piironen et al. 2020). Untersucht wurden die Photopolymer-Typen Clear, High Temp, Dental SG und Dental LT Clear der Firma Formlabs. Obwohl zwei dieser Werkstoffe für den Kurzeiteinsatz zugelassen sind, zeigte die Studie, dass sämtliche Werkstoffe keine gute Zellkompatibilität aufweisen. Weiterhin wurde die Beständigkeit gegenüber der Heißdampfsterilisation untersucht, welche eine Nichtbeständigkeit gegenüber dieser Sterilisationsmethode aufzeigte.

Die Kritik am Stand der Technik zeigt, dass es großen Bedarf für neuartige Produktionsverfahren gibt, um spezialisierte Bioreaktoren für den Einsatz im Tissue Engineering zu fertigen. Die additive Fertigung kann ein solches Fertigungsverfahren sein. Jedoch gibt es aktuell keine geeigneten 3D-Druck-Verfahren sowie zugehörige Werkstoffe, die geeignet sind, um Bioreaktoren zu drucken. Weiterhin kann beobachtet werden, dass auch die Modifikation von Werkstoffen hinsichtlich einer besseren Eignung zur Herstellung von Medizinprodukten nicht im Fokus der Forschung steht. Solche Modifikationen haben aktuell in der Regel das Ziel, bessere mechanische Eigenschaften zu erreichen, betrachten jedoch nicht die Verbesserung der biologischen Eigenschaften (Kowsari et al. 2018).

4 Eigener Ansatz und Konzept der Arbeit

In diesem Kapitel soll der eigene Ansatz zur Erreichung der Ziele aufgezeigt werden. Der Fokus soll dabei auf dem Konzept und dem Vorgehen im Rahmen dieser Arbeit liegen. So soll ein Überblick geschaffen werden, welche Überlegungen, Versuche sowie Experimente durchgeführt werden. Das übergeordnete Ziel ist die Realisierung der Nutzung von additiver Fertigung zur Herstellung spezialisierter Bioreaktoren. Wie im Kapitel 3.7 bereits aufgezeigt wurde, sind vor allem die Werkstoffe aktuell ein limitierender Faktor. Daher liegt ein großer Fokus im Rahmen dieser Arbeit auf dem Thema Werkstoffe.

In diesem Kapitel wird auf folgende Punkte eingegangen:

- Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit
- Erwartete Vorteile durch die Verwendung von additiver Fertigung zur Herstellung von Bioreaktoren
- Realisierungskonzept und durchgeführte Versuche
- Beschreibung des verwendeten 3D-Druckers sowie Ausgangswerkstoffes
- Anwendungen im realen Einsatz

4.1 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Die Aufgabe der hier vorliegenden Arbeit besteht in der Realisierung der Nutzung von additiver Fertigung zur Herstellung von spezialisierten Bioreaktoren. Mit dem Einsatz von additiven Fertigungsverfahren und einem geeigneten Werkstoff sollen die Nachteile des Stands der Technik sowie die Problematik der Translation aus dem Labor an den Patienten gelöst werden. Dabei sollen folgende Ziele erreicht werden:

Charakterisierung des Ausgangswerkstoffes hinsichtlich Biokompatibilität: Für zytotoxische Reaktionen sind in der Regel herauslösbare Bestandteile aus verwendeten Werkstoffen verantwortlich. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein additives Fertigungsverfahren sowie ein zugehöriger Werkstoff ausgewählt, der im ersten Schritt hinsichtlich seiner biologischen Eigenschaften charakterisiert werden soll. Dabei steht vor allem die Identifikation herauslösbarer Bestandteile im Fokus. Basierend auf den Ergebnissen der Untersuchung soll eine Strategie entwickelt werden, um den Werkstoff chemisch so zu modifizieren, dass die Menge der herauslösbaren Bestandteile reduziert werden kann, sodass bei einem Kontakt von bis zu 30 Tagen mit biologischen Systemen keine zytotoxischen Auswirkungen auftreten.

Sterilisierbarkeit mittels Heißdampfs: Die additive Fertigung ermöglicht die Herstellung von Produkten direkt am Ort des Einsatzgebietes, also eine sogenannte „Point-of-Care-Produktion“, sowie die Produktion von Stückzahl eins. Um die gedruckten Produkte an den Patienten zu bringen, wird ein geeigneter Sterilisationsprozess benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit soll das Heißdampfsterilisationsverfahren betrachtet werden. Dabei soll vor allem die Beständigkeit der gedruckten Proben gegenüber der Heißdampfsterilisation untersucht werden.

Transparenz an definierten Stellen: Um optische Analysen an gezüchtetem oder zu kultivierendem biologischem Gewebe durchführen zu können, wird an definierten Stellen gedruckter Probekörper eine Transparenz benötigt. Die Realisierung solcher transparenten Stellen soll im Rahmen dieser Arbeit erarbeitet werden.

Interne sowie externe Validierung des Gesamtprozesses: Eine interne Validierung des Gesamtprozesses soll durch Zytotoxizitätstests mit unterschiedlichen Zelltypen erfolgen. Zusätzlich soll das Anwachsverhalten von Zellen auf gedruckten Probekörpern untersucht werden. In Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Translationszentrum Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskeletale Erkrankungen (TZKME) soll am Beispiel eines gedruckten Bioreaktors für die optimierte Lagerung von Cornea-Gewebe die Validierung dieser Arbeit im realen Einsatz durchgeführt werden.

Weiterhin soll ein eigener Ansatz eines Bioreaktorsystems zur Kultivierung von Zellen außerhalb eines Biolabors vorgestellt werden. Ein denkbarer zukünftiger Einsatz eines solchen Systems kann die schnelle Durchführung von kostengünstigen Zytotoxizitätstest in Büroumgebung sein.

4.2 Erwartete Vorteile der Verwendung von additiver Fertigung zur Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren

Gerade im Bereich der Medizintechnik zeigt der Einsatz von additiver Fertigung mit metallischen Werkstoffen wie Titan große Vorteile. Spezialisierte Implantate, welche optimal auf den Einsatz sowie den Patienten abgestimmt sind, können gefertigt werden und passen somit in den deutlichen Trend hin zur personalisierten Medizin. Weiterhin lassen sich mit der additiven Fertigung neuartige Medizinprodukte fertigen, die mit konventionellen Herstellverfahren nicht möglich waren. Dazu zählen zum Beispiel neuartige Wirbelsäulen-Cages mit feinen porösen Strukturen, die ein besseres Knocheneinwachsen erlauben.

Gelingt es im Rahmen dieser Arbeit zu zeigen, dass mit Hilfe der additiven Fertigung und einem geeigneten Werkstoff Bioreaktoren mittels 3D-Druckens herstellbar sind, könne folgende Vorteile erwartet werden:

- Mit Hilfe der additiven Fertigung lassen sich Strukturen wie Hinterschnitte, komplexe Freiformflächen für beispielweise einen gezielten Strömungsverlauf oder Kanalsysteme fertigen, um Bioreaktorsysteme herzustellen, die bisher in konventionellen Verfahren gar nicht oder nur mit hohen Kosten herstellbar waren.
- Weiterhin können mit Hilfe der additiven Fertigung Baugruppen zusammengefasst werden, um händische Montageschritte zu reduzieren und somit auch die Gefahr einer Kontamination bei dem Zusammenbau des Bioreaktors zu reduzieren.

- Im Bereich der Forschung erlaubt die additive Fertigung in kurzer Zeit Prototypen von Bioreaktoren zu fertigen, um somit schnell verschiedene Iterationen von Entwicklungen zu testen und zu validieren.
- Neben dem Einsatz in der Forschung erlaubt es die additive Fertigung im Rahmen eines validierten Fertigungsprozesses auch Produkte aus dem Labor an den Patienten zu translätieren. Der Einsatz von gedruckten Medizinprodukten am Patienten wurde bereits im metallischen Bereich zur Herstellung von individualisierten Implantaten aufgezeigt.

4.3 Realisierungskonzept, geplante Experimente und realer Einsatz

In diesem Kapitel soll dem Leser aufgezeigt werden, welches Konzept im Rahmen dieser Arbeit verfolgt wurde, um die Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren mittels additiver Fertigung zu realisieren. Abbildung 14 zeigt schematisch das Vorgehen im Rahmen dieser Arbeit.

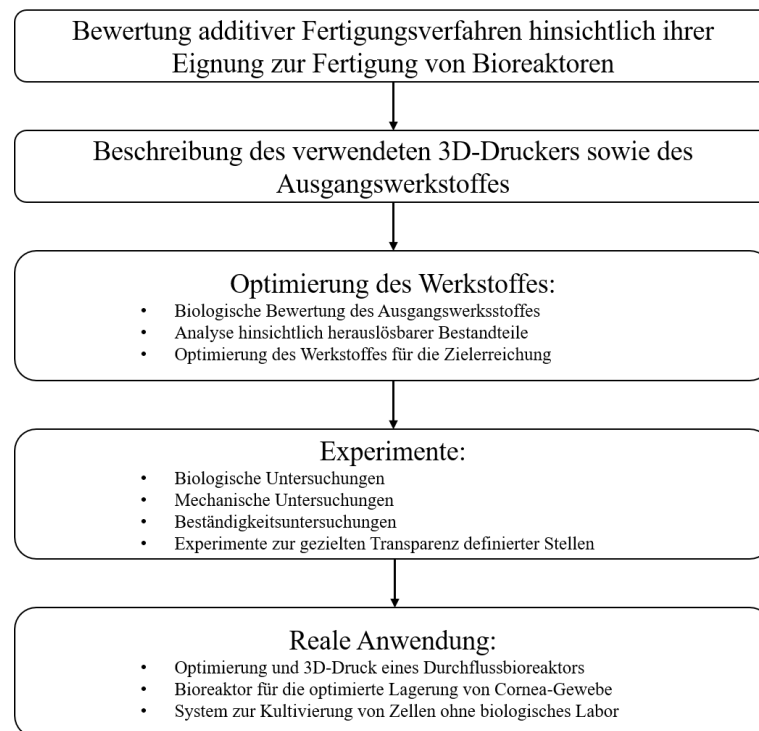


Abbildung 14: Schematisches Vorgehen im Rahmen dieser Arbeit zur Realisierung der additiven Fertigung von Bioreaktoren.

Im ersten Schritt sollen die in Kapitel 3.4 vorgestellten Verfahren der additiven Fertigung hinsichtlich ihrer Eignung für die Herstellung von Bioreaktoren bewertet werden. Basierend auf den Ergebnissen wird die Verwendung des Digital Light Processing im Rahmen dieser Arbeit begründet und der verwendete 3D-Drucker vorgestellt (vgl. Kapitel 5.1). Im Anschluss wird ein Photopolymer als Ausgangswerkstoff für diese Arbeit festgelegt. Weiterhin wird

darauf eingegangen, wieso sich für diesen entschieden wurde, und es werden die einzelnen Bestandteile, sowie das Mischungsverhältnis beschrieben (vgl. Kapitel 5.2).

Wie aus der Kritik am Stand der Technik hervorgeht werden Bioreaktoren aktuell noch nicht kommerziell mit Hilfe der additiven Fertigung hergestellt. Vor allem das Fehlen von geeigneten Werkstoffen, welche hinsichtlich ihrer herauslösbaren Bestandteile, ihrer biologischen Verträglichkeit sowie ihren mechanischen Kennwerten charakterisiert wurden, ist als Grund auszumachen. Um diese Lücke zu schließen liegt der Fokus dieser Arbeit auf dieser Fragestellung. Zunächst soll ein Zytotoxizitätstest mit dem ausgewählten Werkstoff durchgeführt werden, um den Ist-Stand zu bestimmen (vgl. Kapitel 6.1). Anschließend werden in Kapitel 6.2 mit Hilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS) die herauslösbaren Bestandteile untersucht und der Hauptbestandteil dieser identifiziert. Basierend auf den Ergebnissen der HPLC-MS Untersuchungen wird eine Strategie aufgezeigt, um den Werkstoff so zu modifizieren, damit die Menge der herauslösbaren Bestandteile reduziert werden kann, dass auch bei einem Langzeiteinsatz (> 30 Tage) keine zytotoxischen Reaktionen beobachtet werden können (vgl. Kapitel 6.3). In Kapitel 6.4 werden mit verschiedenen Synthesen sowohl biologische als auch mechanische Untersuchungen durchgeführt, um zu untersuchen, ob die erarbeitete Strategie es ermöglicht, die Ziele zu erreichen und ein optimiertes Photopolymer zu erhalten.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollen mit dem optimierten Photopolymer verschiedene Experimente durchgeführt werden. Dazu zählen:

- Mechanische Untersuchungen (vgl. Kapitel 7.2)
- Beständigkeitsuntersuchungen gegenüber Heißdampfsterilisation (vgl. Kapitel 7.3)
- Zytotoxizitätsuntersuchungen (vgl. Kapitel 7.4)
- Oberflächenbehandlung (vgl. Kapitel 7.5)
- Zellbesiedelungsversuche (vgl. Kapitel 7.6)

Im Anschluss an die Durchführung und Auswertung der verschiedenen Experimente soll das optimierte Photopolymer im realen Einsatz angewendet werden. In Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Translationszentrum Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskelettale Erkrankungen (TZKME) soll der Nutzen der additiven Fertigung für die Herstellung von Bioreaktoren im Rahmen der Optimierung eines Durchflussbioreaktors aufgezeigt werden (vgl. Kapitel 8.1). In einer weiteren Zusammenarbeit mit dem TZKME soll ein Bioreaktor zur optimierten Lagerung von Cornea-Gewebe entwickelt und im realen Einsatz mit tierischen Cornea-Transplantaten untersucht werden (vgl. Kapitel 8.2).

Abschließend wird ein Konzept aufgezeigt, mit dem es möglich sein soll mit Hilfe von additiv gefertigten Bioreaktoren, Zellkulturversuche ohne die Anwesenheit eines Biolabors durchzuführen (vgl. Kapitel 8.3).

5 Bewertung additiver Fertigungsverfahren hinsichtlich ihrer Eignung zur Fertigung von Bioreaktoren

In diesem Kapitel sollen die aktuellen additiven Fertigungsverfahren sowie die zugehörigen kommerziell erwerblichen Werkstoffe hinsichtlich ihrer Eignung zur additiven Fertigung von zertifizierbaren Bioreaktoren bewertet werden.

Bei der Bewertung werden insbesondere folgende Punkte betrachtet:

- Fertigungsgenauigkeit
- Oberflächenqualität
- Etablierte Werkstoffe für den Langzeitkontakt (> 30 Tage) mit biologischen Systemen
- Prozesse zur Herstellung von transparenten Bauteilen
- Möglichkeit zur Modifikation der Werkstoffe

Tabelle 1: Bewertung additiver Fertigungsverfahren.

Verfahren/Eigenschaft	ME	MJ	BJ	PBF	VP
Genauigkeit	-	+	o	o	+
Oberflächenqualität	o	+	o	o	+
Werkstoffe für Langzeitkontakt	+	-	-	+	-
Transparente Bauteile	-	o	-	-	o
Möglichkeit zur Modifikation	+	-	-	-	+

Vergleicht man die Genauigkeit der jeweiligen Verfahren schneidet das Material Extrusion-Verfahren am schlechtesten ab. Die Genauigkeit um feine Kanalstrukturen oder glatte Oberflächen zu fertigen, wird hier als nicht ausreichend bewertet. Für die Herstellung von Bioreaktoren wird es deswegen als nicht geeignet eingestuft. Das Material Extrusion-Verfahren sowie das Powder Bed Fusion-Verfahren erlauben aktuell als einzige additive Verfahren die Verarbeitung von polymeren Werkstoffen, die in der Medizintechnik für einen Langzeitkontakt (> 30 Tage) mit biologischen Systemen zugelassen sind. Hierbei handelt es sich um den Werkstoff PEEK. Dieser Werkstoff weist jedoch keinerlei Transparenz auf, weshalb die Anforderung zur Herstellung transparenter Bereiche mit diesem nicht erfüllt werden kann. Für die anderen additiven Fertigungsverfahren existieren lediglich Werkstoffe mit einer Zulassung von bis zu 24 Stunden. Dies wird aktuell als nicht lang genug bewertet, um für die Herstellung von Bioreaktoren, die in der Regel in einem längeren Kontakt mit biologischen Systemen stehen, geeignet zu sein.

Photopolymere für das Material Jetting sowie das Vat Photopolymerization-Verfahren lassen sich grundsätzlich gut modifizieren, da die einzelnen Bestandteile in der Regel kommerziell erwerblich sind. Über Mischungsverhältnisse lassen sich somit Werkstoffeigenschaften

beeinflussen. 3D-Drucker basierend auf dem Material Jetting-Verfahren sind jedoch keine offenen Systeme, was bedeutet, dass sie nur mit Werkstoffen, welche direkt über den Hersteller der 3D-Drucker bezogen werden, befüllt werden können. 3D-Drucker, welche nach dem Vat Photopolymerization-Verfahren arbeiten, sind offene Systeme und eignen sich daher gut für die Verarbeitung modifizierter Werkstoffe.

Basierend auf dieser Analyse wurde sich im Rahmen dieser Arbeit für das Vat Photopolymerization-Verfahren entschieden. Vor allem die Oberflächenqualität sowie die Genauigkeit des Verfahrens zeichnen sich für die Herstellung von feinen Kanalsystemen oder Freiformflächen aus, die für spezialisierte Bioreaktoren von großer Bedeutung sind. Weiterhin können Werkstoffe auf offenen Systemen verarbeitet werden, was eine Modifikation dieser zulässt. Dies ist nötig, da aktuell kein Werkstoff auf dem Markt existiert, der für einen Kontakt von bis zu 30 Tagen mit biologischen Systemen charakterisiert bzw. zugelassen wurde. Die Möglichkeit zur Erzeugung von transparenten Stellen wird ebenfalls als realisierbar mit diesen Werkstoffen eingestuft, da sie im Ausgangszustand (flüssiger Zustand) farblos sind.

5.1 Verwendeter 3D-Drucker

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der 3D-Drucker UV Max (Asiga, Australien) verwendet (vgl. Abbildung 15).



Abbildung 15: 3D-Drucker UV MAX der Firma Asiga.

In Tabelle 2 sind die Spezifikationen des verwendeten 3D-Druckers aufgezeigt. Der Drucker arbeitet nach dem DLP-Verfahren welches im Kapitel 3.4.1 beschrieben wurde.

Tabelle 2: Spezifikationen des verwendeten 3D-Drucker UV MAX.

Spezifikationen	
Maximale Baugröße	119x67x75 mm
Pixelgröße (laterale Auflösung)	62 µm
Minimale Schichtdicke	10 µm
Lichtquelle	385 nm UV-LED
Software	Asiga Composer Software

Der Drucker wird vom Hersteller hauptsächlich für die Verwendung in der Medizintechnik mit einem Fokus auf den Dentalmarkt (Kronen und Brücken, Borschablonen, Dentalmodelle und Bisschienen) sowie den Hörgerätemarkt beworben. Weiterhin handelt es sich um ein offenes System mit freiem Zugriff auf alle Parameter, sodass es optimal geeignet ist, eigene Materialentwicklungen zu verarbeiten.

5.2 Auswahl des Ausgangswerkstoffs

In diesem Kapitel soll aufgezeigt werden, mit welchem Ausgangswerkstoff im Rahmen dieser Arbeit gearbeitet wurde und wieso sich für diesen entschieden wurde. Die Synthese und chemische Modifikation wurde freundlicher Weise von der Firma pro3dure medical GmbH unterstützt, da hierfür nicht die benötigten Geräte am Lehrstuhl für Medizintechnische Materialien und Implantate zur Verfügung standen.

Photopolymere bestehen grundlegend aus den Bestandteilen Grundmonomer, Photoinitiator und Additive wie UV-Stabilisatoren (vgl. Kapitel 3.4.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich für die Verwendung eines Acrylat-basierten Photopolymers entschieden. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die grundlegenden Untersuchungen sowie Modifikationen auch auf andere Photopolymer-Typen sowie Zusammensetzungen übertragbar sind.

Acrylat-basierte Photopolymere werden bereits kommerziell für die Herstellung von Dentalapplikationen mit kurzzeitigem Kontakt (< 24 Stunden) am Patienten eingesetzt. Sie weisen eine gute Stabilität auf und sind farblos, weshalb sie als vielversprechend eingeschätzt werden, im Rahmen dieser Arbeit durch geeignete Modifikationen so optimiert werden zu können, um die Zielsetzungen zu erreichen.

In der Literatur sind eine Vielzahl von Photoinitiatoren beschrieben. Die Arbeit von Bagheri et al. beschreibt ausführlich unterschiedliche Photoinitiatoren (Bagheri et al. 2019). Darin wird dem Photoinitiator Trimethylbenzoyl-Diphenylphosphinoxid (TPO) der Vorteil der Farblosigkeit zugeschrieben, was eine Grundvoraussetzung für die Zielerreichung von transparenten Stellen im gedruckten Bioreaktor ist. Weiterhin gibt es Literatur, die die

Verwendung von TPO zur Herstellung biokompatibler Silikone (UV-aushärtende Silikone) beschreibt (Lin et al. 2011).

Als UV-Stabilisator wurde sich für 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-p-cresol entschieden, welcher bereits in kommerziell erwerblichen Photopolymeren eingesetzt wird und ebenfalls farblos ist.

Zusammenfassend besteht der Ausgangswerkstoff im Rahmen dieser Arbeit aus den folgenden Komponenten:

- Ethoxylierte Grundmonomere Bisphenol-A-Dimethacrylat (BisDMA) (zur Verfügung gestellt von der Firma pro3dure medical GmbH, Deutschland)
- Photoinitiator Trimethylbenzoyl-Diphenylphosphinoxid (TPO) (zur Verfügung gestellt von der Firma pro3dure medical GmbH, Deutschland)
- UV-Stabilisator 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-p-cresol (zur Verfügung gestellt von der Firma pro3dure medical GmbH, Deutschland)

Den größten Anteil mit 98 % machen in der Synthese die Grundmonomere aus. Die Grundmonomere weisen in der Grundmodifikation einen Ethoxylierungsgrad von 10 auf. Die Definition des Ethoxylierungsgrades und dessen Einfluss auf die Eigenschaften des Photopolymers wird im kommenden Teil dieses Kapitels detailliert beschrieben. Der Anteil an Photoinitiator beträgt 0,8 % und der Anteil der UV-Stabilisatoren 1,2 %. Eine detaillierte Beschreibung der jeweiligen Bestandteile ist im Folgenden aufgeführt.

Ethoxylierte Grundmonomere Bisphenol-A-Dimethacrylat (BisDMA)

Den größten Anteil des Photopolymers stellen ethoxylierte Grundmonomere dar, welche als Grundgerüst BisDMA besitzen. Unter Ethoxylierung ist die Anlagerung von Oxyethylengruppen an das Grundgerüst zur Modifikation der Kettenlänge zu verstehen. Das chemische Strukturmodell von BisDMA kann Abbildung 16 entnommen werden.

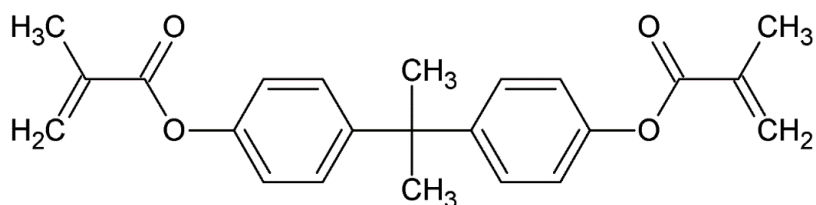


Abbildung 16: Chemische Struktur des Grundmonomers Bisphenol-A-Dimethacrylat.

Das Molekül besteht aus zwei Methylgruppen an einem aromatischen Rückgrat und abschließenden Methacrylat-Gruppen an beiden Enden. Es hat eine molare Masse von 364,3 g/mol. Durch das Einbringen der Oxyethylengruppen können Eigenschaften, wie mechanische Kennwerte oder das Vernetzungsverhalten beeinflusst werden. Die Ethoxylierung geschieht über das Einbringen von Oxyethylengruppen mit einer molaren Masse von 44 g/mol.

Durch das Einbringen von Oxyethylengruppen kann die Kettenlänge der Grundmonomere modifiziert werden. Je nach Anzahl der eingebrachten Oxyethylengruppen wird von einem entsprechendem Ethoxylierungsgrad gesprochen (vgl. Abbildung 17).

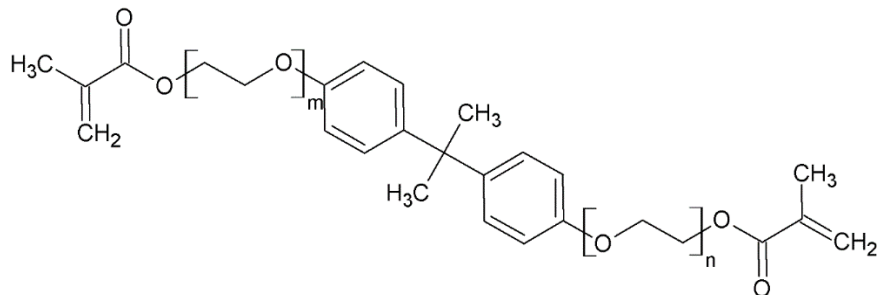


Abbildung 17: Ethoxyliertes BisDMA. Über eingebrachte Oxyethylengruppen (Anzahl n/m) kann die Kettenlänge des Grundmonomers modifiziert werden.

Photoinitiator

Zum Starten der Vernetzungsreaktion beinhaltet das Photopolymer den Photoinitiator Trimethylbenzoyl-Diphenylphosphinoxid (TPO) mit einer molaren Masse von 348 g/mol (vgl. Abbildung 18).

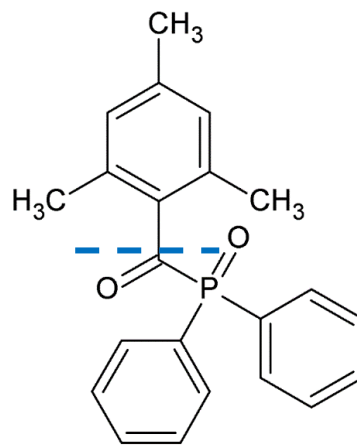


Abbildung 18: Struktur des Photoinitiators Trimethylbenzoyl-Diphenylphosphinoxid (TPO). Das Molekül bricht bei Eintrag energiereicher UV-Strahlung auf und bildet so Radikale, welche die Vernetzungsreaktion starten. Die Aufbruchsstelle ist mit der gestrichelten Linie markiert.

TPO zählt zu den spaltbaren Photoinitiatoren, die bei Eintrag von energiereicher Strahlung an einer C-C-Bindung aufbrechen und zwei Radikale bilden. Diese initiieren anschließend die Kettenpolymerisation.

UV-Stabilisator

Die hohe Reaktivität von Radikalen kann ungewollte Vernetzungsreaktionen hervorrufen, sowie zu Kettenabbrüchen innerhalb des Polymers führen. Um solchen Effekten entgegenzuwirken, wird dem Photopolymersystem der UV-Stabilisator 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-p-kresol mit einer molaren Masse von 225,25 g/mol zugegeben (vgl. Abbildung 19).

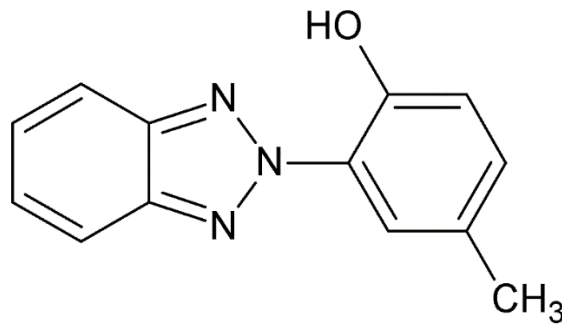


Abbildung 19: Struktur des UV-Stabilisators 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-p-kresol. Der UV-Stabilisator wird dem Photopolymersystem zugegeben, um ungewollte Vernetzungsreaktionen zu verhindern und Alterungseffekte zu minimieren.

Mit Hilfe des UV-Stabilisators und der Menge an Photoinitiatoren im Photopolymersystem kann der Werkstoff gezielt auf die Verarbeitung in einem bestimmten DLP-Drucker angepasst werden. Vor allem die Durchhärtetiefe und die Geschwindigkeit der Vernetzungsreaktion können beeinflusst werden, sodass das Photopolymer auf dem Drucker optimal verarbeitet werden kann.

6 Optimierung des Photopolymers für die Realisierung der additiven Fertigung von Bioreaktoren

In diesem Kapitel geht es um die Charakterisierung des gewählten Ausgangswerkstoffes sowie die anschließende chemische Optimierung des Werkstoffes. Zu Beginn wird mit Hilfe von Zytotoxizitätstest der Ausgangswerkstoff hinsichtlich seiner toxischen Auswirkungen beurteilt. Ziel ist es den Werkstoff im Langzeiteinsatz (> 30 Tage) anwenden zu können. Im Anschluss an die Zytotoxizitäts-Vorversuche wird eine chemische Analyse durchgeführt, um zu bestimmen, ob und welche Anteile sich aus dem Werkstoff herauslösen. Mit diesen Ergebnissen wird eine chemische Optimierung am Werkstoff vorgenommen, damit dieser die Zielerfordernisse erreicht und für die Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren geeignet ist.

6.1 Zytotoxizität des Ausgangswerkstoff

Zu Beginn wurde, der im Rahmen dieser Arbeit gewählte Ausgangswerkstoff hinsichtlich des Ist-Standes seiner zytotoxischen Eigenschaften untersucht. Die Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden in Anlehnung der Norm DIN EN ISO 10993-5 durchgeführt. Es wurden Elutionszeiten von 3, 7, 14 und 30 Tage gewählt und als Zelltyp Fibroblasten (Hs27) verwendet.

Hypothese

Die Hypothese dieses Experiments bezieht sich auf die Beobachtung von zytotoxischen Eigenschaften nach unterschiedlichen Elutionszeiten gedruckter Probekörper des gewählten Ausgangswerkstoffes:

- Nullhypothese H_0 : Nach den jeweiligen Elutionszeiten können zytotoxische Reaktionen beobachtet werden.
- Alternativhypothese H_1 : Nach den jeweiligen Elutionszeiten können keine zytotoxischen Reaktionen beobachtet werden.

Können nach den jeweiligen Elutionszeiten keine zytotoxischen Reaktionen beobachtet werden, wird der Werkstoff für diesen Zeitraum als geeignet angesehen.

Kultivierung der Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien für die Zytotoxizitäts-Vorversuche wurden in dem Inkubator CB 150 (Binder GmbH, Deutschland) bei 37 °C und 10 % CO₂-Gehalt kultiviert. Für die Kultivierung der Hs27 Zelllinie wurde das Fertigmmedium Dulbecco's MEM (Biochrom GmbH, Deutschland) verwendet.

Vorbereitung der Probekörper und Referenzen

Für die Durchführung der Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden viereckige Probekörper mit den Maßen 50 mm x 10 mm x 1 mm mit dem 3D-Drucker UV Max (Asiga, Australien) mit einer Schichtdicke von 100 µm hergestellt. Die gedruckten Probekörper wurden händisch mit 99,8 %iger Ethanollösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) gereinigt, um anhaftendes Restphotopolymer zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Reinigung im Ultraschallbad Super RK 255 H (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) ebenfalls mit 99,8 %iger Ethanollösung für 10 Minuten. Nach der Reinigung wurden die Probekörper in der UV-Kammer CD-1 (pro3dure medical GmbH, Deutschland) für 4 Minuten unter Stickstoffatmosphäre ausgehärtet.

Als Positivkontrolle wurden Kupferplättchen in denselben Maßen vorbereitet. Alle Probekörper wurden in Sterilisationsbeutel verpackt und mit dem Autoklaven Hospiklav 25-Typ B (SHP Steriltechnik AG, Deutschland) bei 121 °C für 15 Minuten heißdampfsterilisiert. Die Probekörper wiesen jeweils eine Oberfläche von 11,2 cm² auf.

Herstellung der Eluate

Die Herstellung der Eluate erfolgte nach der Norm DIN EN ISO 10993-12. Unter einer Sterilwerkbank wurden dazu 5-mal je 3 der vorbereiteten Probekörper mit Hilfe einer sterilen Pinzette in ein steriles 15 ml Flacon Tube überführt. Um das in der Norm geforderte Extraktionsverhältnis von $3 \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$ zu erfüllen wurden in jedes Falcon Tube 11,2 ml des Zellkulturmediums gegeben. Als Positivkontrolle dienen die vorbereiteten Kupferplättchen, deren Extrakte auf dieselbe Weise vorbereitet wurden. Als Negativkontrolle wurde 11,2 ml reines Zellkulturmedium in ein Falcon Tube gegeben.

Alle Proben wurden anschließend im Inkubator CB 150 (Binder GmbH, Deutschland) bei 37 °C und 10 % CO₂-Gehalt für die Elutionszeiten von 3, 7, 14 und 30 Tage inkubiert.

Durchführung der Zytotoxizitätsuntersuchungen

Zur Untersuchung der zytotoxischen Eigenschaften wurden WST-8 Tests in 96er-Well-Plates (Mikrotiterplatte) durchgeführt. Einen Tag vor dem Zusammenbringen von Zellen und Eluaten wurden unter einer Sterilwerkbank 100 µl einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von $5000 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$ in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert.

Anschließend wurde die besiedelte Mikrotiterplatte für 24 Stunden bei 37 °C und 10 % CO₂-Gehalt inkubiert, sodass die Zellen adhäreren konnten. Nach der Inkubation wurde das Zellkulturmedium unter einer Sterilwerkbank vorsichtig abgesaugt und in die Wells 5-mal jeweils 100 µl aus je einem der 5 Eluate der gedruckten Probekörper pipettiert. In 5 weitere Wells wurde jeweils 100 µl der Eluate der Positivkontrolle (Kupfereluat) sowie in 5 weitere

Wells 100 μ l der Negativkontrolle gegeben. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation für 72 Stunden.

Im Anschluss an die Inkubation wurden erneut unter einer Sterilwerkbank die Elutionslösungen abgesaugt und 100 μ l einer WST-Zellkulturmedium-Suspension (Verhältnis 1:10) in die jeweiligen Wells gegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 1 Stunde wurde in einem Photometer die Absorption bei den Wellenlängen von 450 nm sowie 620 nm gemessen. Die gemessenen Werte wurden auf die Negativkontrolle referenziert und so die relative Zellvitalität bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Auswertung erfolgte nach der Norm DIN EN ISO 10993-5. Ein Rückgang der Proliferationsrate von über 30 % referenziert auf die Negativkontrolle wird als zytotoxische Reaktion bewertet.

Für die Auswertung wurden als statistische Größen der Minimal- und Maximalwert, Median, sowie das 25 % und 75 % Quantil ermittelt. Die Werte der vier Gruppen sind normalverteilt und wurden mit Hilfe des t-Tests gegenüber dem Testmittelwert 70 % (Zytotoxizitätsgrenze) verglichen. Die Darstellung erfolgt über Boxplots mit $n=5$ und $*=p\leq 0,05$ (vgl. Abbildung 20).

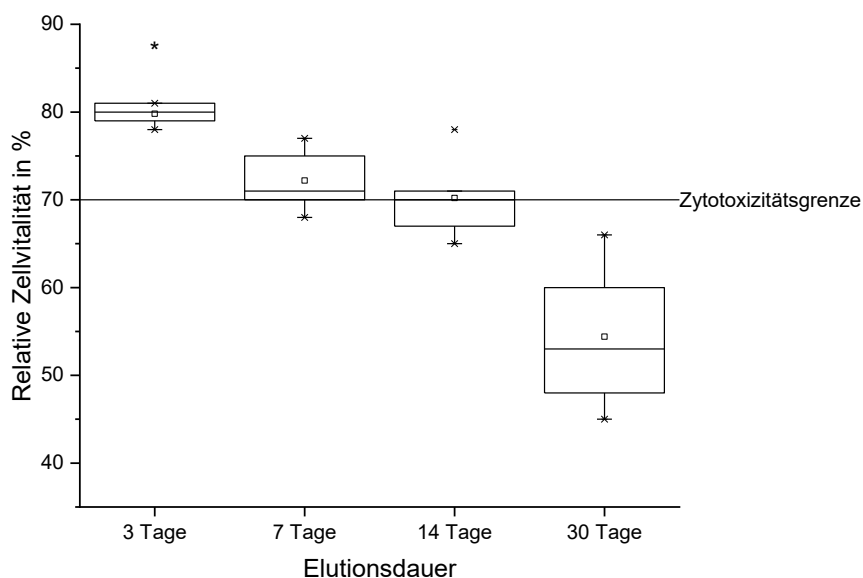


Abbildung 20: Zellproliferation von Fibroblasten nach Kontakt mit Eluaten gedruckter Probekörper dargestellt als Boxplot, mit $n=5$ und $*=p\leq 0,05$. Ab einer Elutionsdauer von 7 Tagen sind zytotoxische Reaktionen beobachtbar.

Bei einer Elutionsdauer der gedruckten Probekörper von 3 Tagen ist die Zellproliferation referenziert auf die Negativkontrolle signifikant höher als der Testmittelwert 70 % (Zytotoxizitätsgrenze). Die Ergebnisse bei einer Elutionsdauer von 7, 14 und 30 Tagen zeigen keine signifikant höheren Werte gegenüber dem Testmittelwert 70 %. Es wird somit von einer Zytotoxizität ausgegangen.

Aus den Ergebnissen der Untersuchung lässt sich schlussfolgern, dass sich nach einer Elutionszeit von 7 Tagen bereits Bestandteile in einer toxischen Konzentration aus den Probekörpern herausgelöst haben. Für den Einsatz der Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren ist das Photopolymer nicht geeignet. Um das Photopolymer gezielt zu modifizieren und die Menge der herauslösbaren Bestandteile zu reduzieren, müssen diese im ersten Schritt charakterisiert werden und ihr Hauptbestandteil identifiziert werden.

6.2 Identifikation von herauslösbaren, potenziell toxischen Substanzen

Bioreaktoren stehen bei ihrem Einsatz in der Regel in dauerhaften Kontakt mit wässrigem Medium. Dabei kann es zu einem Herauslösen von Bestandteilen aus dem Werkstoff kommen, die eine toxische Wirkung auf Zellen oder Gewebe haben können. Diese potenziell toxischen Bestandteile sollen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS Analyse) identifiziert werden.

Die HPLC ist eine Methode zur Auftrennung von Substanzen. Mit einer anschließenden MS-Analyse lassen sich die aufgetrennten Substanzen identifizieren und Massenspektren messen. Bei der HPLC wird die zu untersuchende Substanz in ein Laufmittel, die sogenannte mobile Phase eingespritzt und wird mit diesem zusammen durch eine Trennsäule, die eine stationäre Phase enthält, gepumpt. Die Stärke der Wechselwirkung der Bestandteile der zu untersuchenden Substanz mit den jeweiligen Phasen bestimmt die Verweildauer innerhalb der Trennsäule. Eine starke Wechselwirkung mit der stationären Phase erhöht die Retentionszeit, während eine starke Wechselwirkung mit der mobilen Phase die Retentionszeit reduziert.

Die gängigste Methode der HPLC ist die Reverse Phase-HPLC (RP-HPLC). In der Trennsäule wird eine unpolare stationäre Phase verwendet (in der Regel chemisch modifizierte poröse Kieselgel Partikel). Als polare mobile Phase dient ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril. Die unpolaren Bestandteile der zu untersuchenden Substanz wechselwirken mit der stationären Phase und verbleiben länger in der Trennsäule.

Nach dem Durchlaufen der Trennsäule wird bei der Massenspektrometrie der Analyt in die Gasphase überführt und ionisiert. In einem elektrischen Feld werden die Ionen beschleunigt und einem Analysator zugeführt. Dieser trennt die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis $\frac{m}{z}$. Ein Detektor erfasst die separierten Ionen und es wird ein MS-Spektrum ausgegeben.

Abbildung 21 zeigt den schematischen Ablauf der Untersuchung.

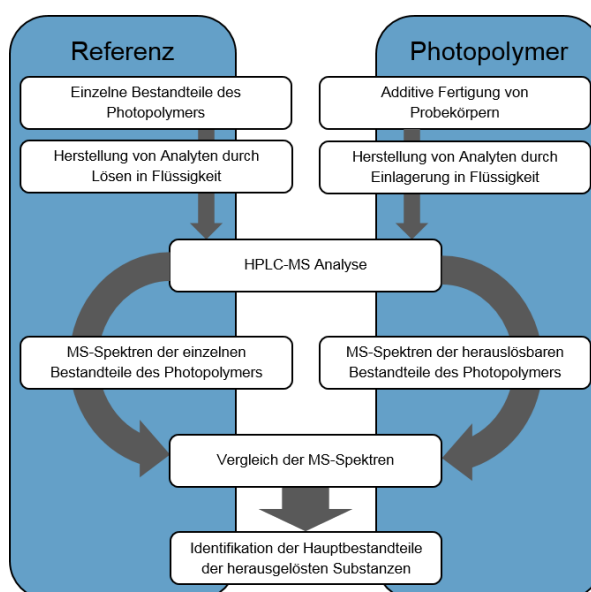


Abbildung 21: Aus den einzelnen Bestandteilen des Photopolymers sowie aus additiv gefertigten Probekörpern werden Analyten hergestellt. Mittels HPLC-MS Analyse werden MS-Spektren der jeweiligen Analyten ausgegeben. Durch den Vergleich der MS-Spektren lassen sich die Hauptbestandteile der herauslösbaren Substanzen identifizieren.

Für die Charakterisierung der herauslösbaren Bestandteile werden das Photopolymer sowie jeweils die einzelnen Bestandteile des Photopolymers verwendet. Die einzelnen Bestandteile des Photopolymers dienen als Referenz, um mittels HPLC-MS Analyse Massenspektren dieser zu erzeugen, um diese den jeweiligen Bestandteilen zuzuordnen.

Im Anschluss werden Massenspektren von Eluaten gedruckter Probekörper des Photopolymers gemessen, welche qualitativ mit den Referenzspektren verglichen werden, um die herauslösbaren Bestandteile charakterisieren und den Hauptbestandteil dieser identifizieren zu können.

Vergleich der MS-Spektren

Die MS-Spektren der einzelnen Bestandteile des Photopolymers dienen als Referenzmessungen. Jedem Bestandteil kann somit eine bestimmte Abfolge von Peaks und deren Massenzahlen zugeordnet werden. Um die herauslösbaren Substanzen, die potentiell toxische Wirkungen mit sich bringen, zu identifizieren werden die MS-Spektren der Eluate von additiv gefertigten Probekörpern mit den MS-Spektren der einzelnen Bestandteile des Photopolymers hinsichtlich ihrer aufgezeigten Peaks und Massen verglichen. So kann der Hauptbestandteil der herauslösbaren Bestandteile identifiziert werden und das Photopolymer

gezielt chemisch modifiziert werden, um die Menge der herauslösbaren Bestandteile zu reduzieren.

Herstellung und Vorbereitung der Probekörper

Für die Eluatherstellung wurden rechteckige Probekörper (50 mm x 10 mm x 1 mm) mit dem 3D-Drucker ASIGA MAX UV (Asiga, Australien) bei einer Schichtdicke von 100 µm hergestellt. Die gedruckten Probekörper wurden händisch mit 99,8 %iger Ethanollösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) gereinigt, um anhaftendes Restphotopolymer zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Reinigung im Ultraschallbad Super RK 255 H (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) ebenfalls mit 99,8 %iger Ethanollösung für 10 Minuten. Nach der Reinigung wurden die Probekörper in der UV-Kammer CD-1 (pro3dure medical GmbH, Deutschland) für 4 Minuten unter Stickstoffatmosphäre ausgehärtet.

Herstellung von Eluaten und Analyten

Zur Herstellung der Eluate der additiv gefertigten Probekörper wurde in 20 Stück 100 ml Vierkant-Laborflaschen jeweils ein Probekörper gegeben. Anschließend wurde in zehn Vierkant-Laborflaschen jeweils 50 ml deionisiertes Wasser und in 10 Vierkant-Laborflaschen 50 ml 99%iges Ethanol gegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die Probekörper jeweilig vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Das Extraktionsverhältnis betrug 0,3 g/10 ml. Jeweils 5 der Probekörper mit deionisiertem Wasser und Ethanol wurden bei 37 °C bzw. bei 70 °C für 7 Tage extrahiert. Die erhöhte Temperatur sollte für eine Beschleunigung der Extraktion sorgen. Nach der Extraktion wurden die Eluate der zusammengehörigen Extrakte gepoolt, sodass jeweils ein Analyt von 250 ml entstand. Dieser wurde in Chromatographie-Gläschen für die HPLC-MS Analyse abgefüllt.

Das ausgewählte Photopolymer besteht aus den folgenden Einzelbestandteilen:

- Monomergemisch Bisphenol-A-Dimethacrylat (zur Verfügung gestellt von pro3dure medical GmbH, Deutschland)
- Photoinitiator TPO (zur Verfügung gestellt von pro3dure medical GmbH, Deutschland)
- UV-Stabilisator 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-p-kresol (zur Verfügung gestellt von pro3dure medical GmbH, Deutschland)

Von den Bestandteilen wurden jeweils 1 mg in 1 ml Acetonitril gelöst und in Chromatographie-Gläschen gefüllt. Zusätzlich wurden Referenz-Analyten aus deionisiertem Wasser und Ethanol zur Analyse abgefüllt.

HPLC-MS Analyse

Für die HPLC-MS-Analyse wurde mit der Gradienten-Methode gearbeitet. Zu Beginn setzte sich die mobile Phase aus 70 % Wasser und 30 % Acetonitril zusammen. Die mobile Phase wurde mit einer Durchflussrate von 0,55 ml/min für 30 Minuten durch die stationäre Phase (C-18 Chromatographie-Säule mit chemisch modifizierten, porösen Kieselgel-Partikeln) geleitet. Bis zum Ende der Chromatographie wurde der Anteil von Acetonitril in der mobilen Phase linear bis auf 100 % gesteigert. Die Chromatographie-Säule (TYP C-18, 3 µm x 2,1 mm x 125 mm) wurde konstant auf einer Temperatur von 35 °C gehalten.

Die hergestellten Eluate wurden in Chromatographie-Gläschen gefüllt und in den Probenhalter der HPLC-Anlage (Agilent Technologies GmbH, Deutschland) gestellt. Ein Greifarm brachte die zu untersuchende Probe in Position und über eine Nadel wurde eine definierte Menge an Analyt in die mobile Phase eingespritzt. Tabelle 3 zeigt die Einspritzmengen der jeweiligen Analyten.

Tabelle 3: Einspritzmengen der jeweiligen Analyten.

Analyt	Einspritzmenge in µl
Ethoxyliertes BisDMA	1
UV-Initiator TPO	1
UV-Stabilisator	1
Referenz: Wasser	20
Referenz: Ethanol	20
Eluat: deionisiertes Wasser 37 °C	30
Eluat: deionisiertes Wasser 70 °C	30
Eluat: Ethanol 37 °C	2
Eluat: Ethanol 70 °C	2

Die Einspritzmengen der Eluate in Ethanol wurden geringer gewählt, da hier eine höhere Konzentration der herausgelösten Substanzen erwartet wurde. Eine zu hohe Konzentration kann zu einer Überladung der Trennsäule und einer fehlerhaften Messung führen. Nach dem Auftrennen der Analyten in der Chromatographie-Säule wurden die Analyten durch einen UV-Detektor mit einer Wellenlänge von 220 nm erfasst und zur MS-Analyse (Thermo Fisher Scientific BV & Co KG, Deutschland) weitergeleitet. Die Ergebnisse des UV-Detektors wurden nicht für die Auswertung verwendet. Das Massenspektrometer detektiert das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis $\frac{m}{z}$ und gibt das Ergebnis in einem MS-Spektrum aus.

Ergebnisse und Diskussion der Massenspektren

Auf Grund des großen Umfangs der erhaltenen Spektren wird an dieser Stelle nur auf die wesentlichen und zur Interpretation und Diskussion notwendigen Ergebnisse eingegangen. Im Anhang A sind die eben aufgezählten Massenspektren im Detail zu sehen.

Es wurden folgende Massenspektren erzeugt:

- Massenspektren von deionisiertem Wasser und reinem Ethanol (vgl. Anhang A1)
- Massenspektren des reinen Monomers (vgl. Anhang A2)
- Massenspektrum des reinen Photoinitiators TPO (vgl. Anhang A3)
- Massenspektrum des reinen UV-Stabilisators (vgl. Anhang A4)
- Massenspektrum des hergestellten Eluates aus additiv gefertigten Probekörper (vgl. Anhang A5)

Abbildung 22 zeigt die Retentionszeit detektierter Substanzen des in deionisiertem Wasser bei 37 °C gewonnenen Eluats von additiv gefertigten Probekörpern.

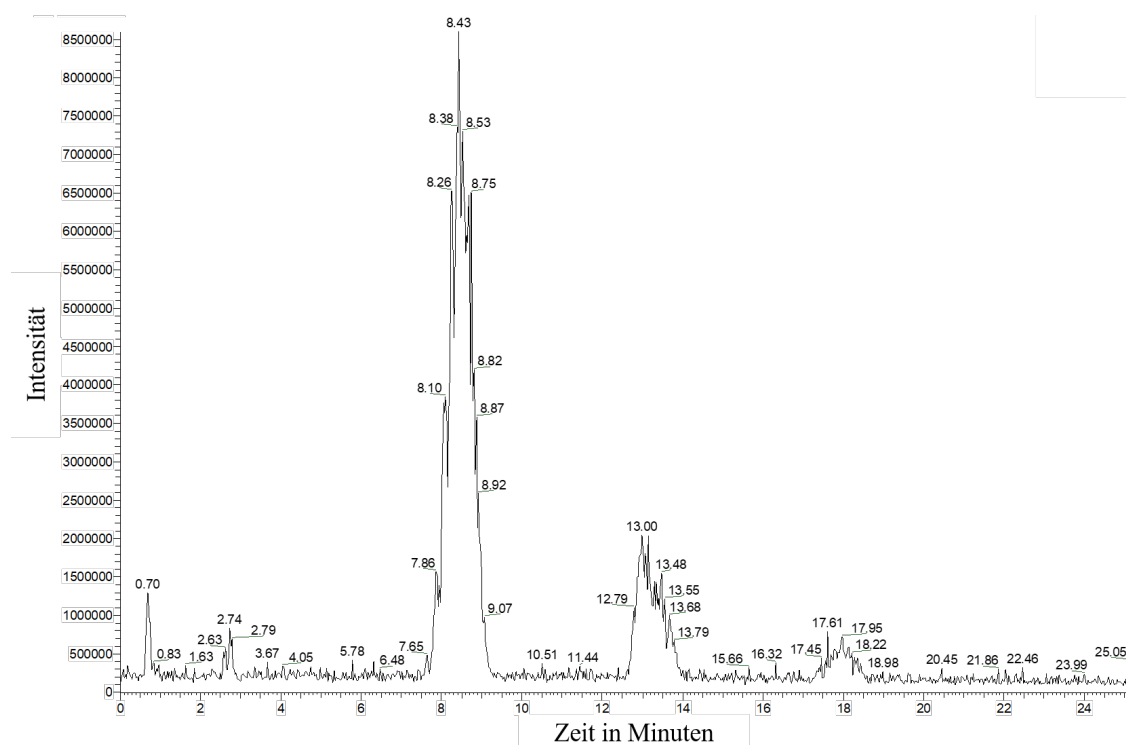


Abbildung 22: Intensität detektierter Substanzen des in deionisiertem Wasser bei 37 °C gewonnenen Eluats aus additiv gefertigten Probekörpern gegenüber der Retentionszeit.

Das Spektrum zeigt, dass sich herauslösbare Substanzen aus gedruckten Probekörpern aus dem Photopolymer nachweisen lassen. Folgende Peaks können im Spektrum beobachtet werden:

- Peak geringer Intensität zu der Retentionszeit von 0,7 Minuten
- Peak geringer Intensität zu der Retentionszeit von 2,6 Minuten
- Peak hoher Intensität im Retentionszeitraum von 7,4 bis 9,9 Minuten
- Peak mittlerer Intensität im Retentionszeitraum von 12,3 bis 14,4 Minuten
- Peak geringer Intensität im Retentionszeitraum von 17 bis 19,1 Minuten

Den Massenzahlen der ersten beiden Peaks zu den Retentionszeiten von 0,7 Minuten und 2,6 Minuten können lediglich die Massenzahlen der Verschmutzungen zugeordnet werden (vgl. Referenzmessungen mit reinem Wasser sowie reinem Ethanol in Anhang A1). Im Folgendem wird exemplarisch der Retentionszeitraum von 7,4 bis 9,9 Minuten detaillierter betrachtet. Abbildung 23 zeigt die Massenzahlen detektierter Substanzen während dieses Zeitraumes.

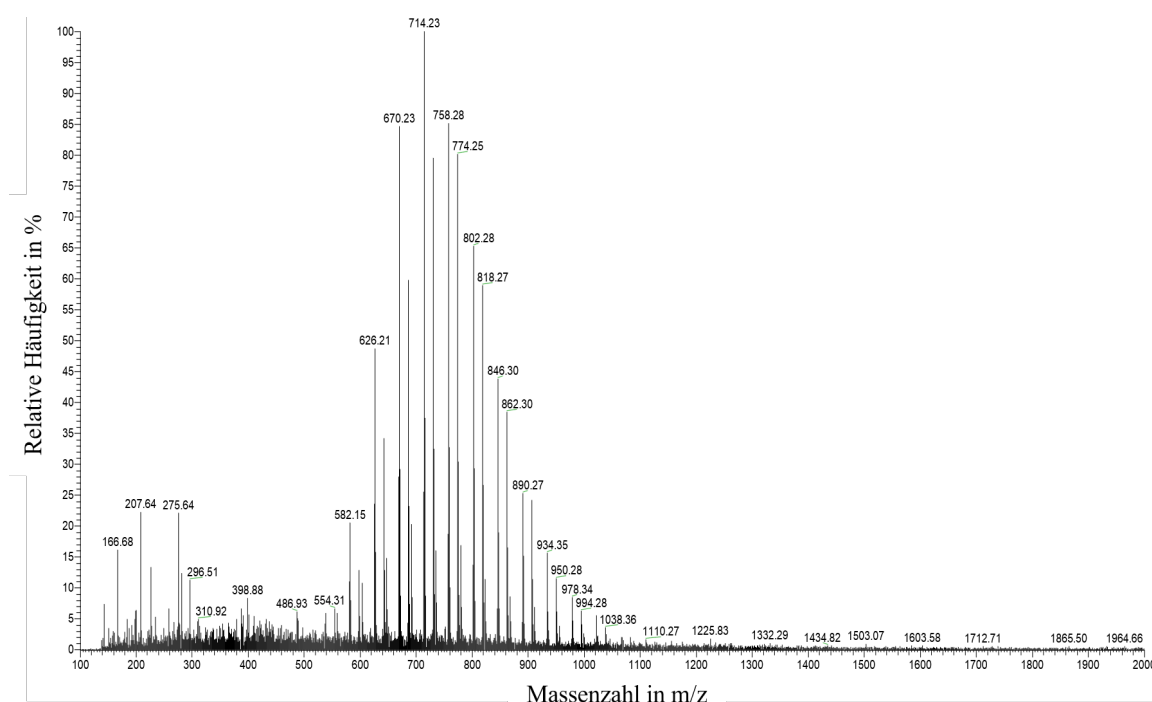


Abbildung 23: Massenzahlen detektierter Substanzen des in deionisierten Wasser bei 37 °C gewonnen Eluats im Retentionszeitraum 7,44 bis 9,83 Minuten.

Während der Retentionszeit von 7,44 Minuten bis 9,83 Minuten können die Massenzahlen 166, 207, 275, und 296 detektiert werden. Diese werden Verunreinigungen, welche auch in den Referenzmessungen mit reinem Wasser sowie reinem Ethanol gemessenen wurden (vgl. Anhang A1), zugeordnet.

Weiterhin können die Massenzahlen 582, 626, 670 714, 758, 802, 846, 890, 934, 978 detektiert werden. Diesen Massenzahlen werden ethoxylierten BisA Molekülen mit zwei zusätzlich anhaftenden Protonen zugeordnet (vgl. Tabelle 19). Zusätzlich können die Massenzahlen 774, 818, 862, 906, 950, 994 und 1038 detektiert werden. Diesen Massenzahlen werden

ethoxylierten BisA Molekülen mit einem zusätzlichen Ammoniumion zugeordnet (vgl. Tabelle 19).

Vergleicht man die gemessenen Daten mit den Spektren der Referenzen (reines Wasser, reines Ethanol, reines Photopolymer, reine UV-Stabilisatoren, reine Photoinitiatoren) kann gezeigt werden, dass sämtliche herauslösbaren Bestandteile auf Monomere des Photopolymers zurückzuführen sind. Es wird davon ausgegangen, dass trotz UV-Aushärtung unvernetzte Monomere in 3D-gedruckten Bauteilen zu finden sind und sich in wässrigem Medium herauslösen. Diese unvernetzten Monomere werden somit für die toxischen Reaktionen verantwortlich gemacht.

Tabelle 4: Zuordnung der Massenzahlen der Retentionszeit von 7,4 bis 9,9 Minuten.

Massenzahl	Grundsubstanz	Ethoxylierungsgrad	Zusatzsubstanz
582	BisA (228,3 g/mol)	7 x EO (308 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
626	BisA (228,3 g/mol)	8 x EO (352 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
670	BisA (228,3 g/mol)	9 x EO (396 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
714	BisA (228,3 g/mol)	10 x EO (440 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
758	BisA (228,3 g/mol)	11 x EO (484 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
802	BisA (228,3 g/mol)	12 x EO (528 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
846	BisA (228,3 g/mol)	13 x EO (572 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
890	BisA (228,3 g/mol)	14 x EO (616 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
934	BisA (228,3 g/mol)	15 x EO (660 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
978	BisA (228,3 g/mol)	16 x EO (704 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
774	BisA (228,3 g/mol)	12 x EO (528 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
818	BisA (228,3 g/mol)	13 x EO (572 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
862	BisA (228,3 g/mol)	14 x EO (616 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
906	BisA (228,3 g/mol)	15 x EO (660 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
950	BisA (228,3 g/mol)	16 x EO (704 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
994	BisA (228,3 g/mol)	17 x EO (748 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1038	BisA (228,3 g/mol)	18 x EO (792 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)

Folgerungen für die chemische Optimierung des Photopolymers

Anhand des Vergleichs der Massenspektren der Eluate aus additiv gefertigten Probekörpern mit den Referenzspektren der einzelnen Bestandteile des Photopolymers lassen sich Restmonomere als größter Bestandteil der herauslösbaren Substanzen identifizieren. In den hergestellten Eluaten aus den additiv gefertigten Probekörpern konnten keine Photoinitiatoren oder UV-Stabilisatoren nachgewiesen werden.

Es wird davon ausgegangen, dass die Konzentration der herauslösbaren Restmonomere die letale Dosis für Fibroblasten übersteigt und somit zytotoxisch wirkt. Um das Photopolymer für die Herstellung von Bioreaktoren im Langzeiteinsatz zu nutzen, soll es chemisch modifiziert werden. Ziel ist es die chemische Zusammensetzung des Photopolymers zu verändern, damit die Menge an herauslösbaren Bestandteilen reduziert werden kann, und somit keine zytotoxischen Reaktionen von gedruckten Bauteilen erwartet werden können.

6.3 Chemische Optimierung des Photopolymers

Wie in Kapitel 5.2 beschrieben wurden im ausgewählten Ausgangswerkstoff Monomere mit einem mittleren Ethoxylierungsgrad von 10 verwendet. Die HPLC-Untersuchungen haben gezeigt, dass der Hauptbestandteil der herauslösbaren Bestandteile unvernetzte Monomere sind. Das Ziel der chemischen Optimierung des Werkstoffes ist es die Menge an herauslösbaren Restmonomeren zu reduzieren. Dies soll realisiert werden indem die Kettenlängen des Grundmonomers modifiziert werden.

Die chemische Zusammensetzung von UV-vernetzenden Systemen hat einen maßgeblichen Einfluss auf herauslösbare Substanzen und damit auch auf die zytotoxischen Eigenschaften (Nishi et al. 1995). Ogliari et al. untersuchten in ihrer Studie den Einfluss von Kettenlängenänderung aromatischer Dimethacrylate (Ogliari et al. 2008). Durch das Einbringen von unterschiedlich vielen Oxyethylengruppen wurden die Kettenlängen angepasst. Die Studie zeigt, dass die mechanischen Kennwerte (E-Modul und Biegefestigkeit) mit kürzeren Kettenlängen deutlich zunehmen, sowie die Wasseraufnahme signifikant abnimmt. Zurückzuführen ist dies auf zwei Hauptfaktoren. Einerseits auf die steigende Anzahl polarer Gruppen (Oxyethylengruppen) sowie die Polymer-Netzwerkstruktur. Zur Beschreibung der Polymer-Netzwerkstruktur wird ein sogenannter „Network-Parameter M_c “ (vgl. Formel 7) bestimmt (Barszczewska-Rybarek et al. 2000, Ogliari et al. 2008).

$$M_c = \frac{MW}{q} \quad (7)$$

mit MW = molare Masse und q = Quervernetzungsichte.

Der Network-Parameter M_c ist somit definiert als durchschnittliches molekulares Gewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten einer Kette. Je höher der Faktor ist, desto beweglicher ist die Kette, was das Polymer „weicher“ macht. Gleichzeitig bietet die Netzwerkstruktur Platz für das Eindiffundieren von Wassermolekülen, welche nicht vernetzte Bestandteile herauslösen können.

Die chemische Optimierung soll diesen Zusammenhang für das ausgewählte Photopolymer untersuchen und eine optimale Zusammenstellung der Polymersynthese vorschlagen. Dazu wurden in Zusammenarbeit mit einem externen Partner (pro3dure medical GmbH, Deutschland) Synthesen von verschiedenen Photopolymeren mit definierten unterschiedlichen Ethoxylierungsgraden (EO-Grad) hergestellt (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5: Hergestellte Synthesen mit unterschiedlichen Ethoxylierungsgraden.

Synthese	Mittlerer Ethoxylierungsgrad	Mittlere molare Masse in g/mol
EO2	n/m=2	452,3
EO3	n/m=3	496,3
EO4	n/m=4	540,3
EO10	n/m=10	804,3
EO30	n/m=30	1684,3

6.4 Biologische und mechanische Untersuchung der modifizierten Photopolymer-Synthesen

Mit den jeweiligen Synthesen wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt, um den direkten Einfluss der Kettenlängen auf die zytotoxischen Eigenschaften zu untersuchen. Weiterhin wurden mit den Synthesen Zugprüfkörper gedruckt und Zugversuche durchgeführt, um den Einfluss der Kettenlängen auf die mechanischen Eigenschaften zu untersuchen.

6.4.1 Zytotoxizitätstests der unterschiedlichen Synthesen

Um den Einfluss der unterschiedlichen Kettenlängen auf die Biokompatibilität zu untersuchen, wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt. Die Durchführung erfolgte bis auf die Dauer der UV-Nachbelichtung analog zu den bereits beschriebenen Zytotoxizitätsuntersuchungen (vgl. Kapitel 6.1). Die Dauer der Elution betrug 7 Tage.

Um neben den Einfluss der Ethoxylierungsgrade der Monomerketten auch den Einfluss der UV-Nachbelichtung auf die Biokompatibilität zu untersuchen wurden 0, 2 und 4 Minuten UV-belichtete Probekörper verwendet.

Ergebnis und Diskussion

Die Auswertung erfolgte nach der Norm DIN EN ISO 10993-5. Ein Rückgang der Proliferationsrate von über 30 % referenziert auf die Negativkontrolle wird als zytotoxische Reaktion bewertet.

Für die Auswertung wurden als statistische Größen der Minimal- und Maximalwert, Median, sowie das 25 % und 75 % Quantil ermittelt. Die Werte aller Gruppen sind Normalverteilt und wurden mit Hilfe des t-Tests gegenüber dem Testmittelwert 70 % (Zytotoxizitätsgrenze) verglichen. Die Darstellung erfolgt über Boxplots mit $n=5$ und $*=p\leq 0,05$ (vgl. Abbildung 24). Weiterhin wurde ein Tukey-post hoc Test durchgeführt, um die Mittelwerte aller Gruppen untereinander zu vergleichen. Die Darstellung erfolgt tabellarisch mit $*=p\leq 0,05$ (vgl. Tabelle 6).

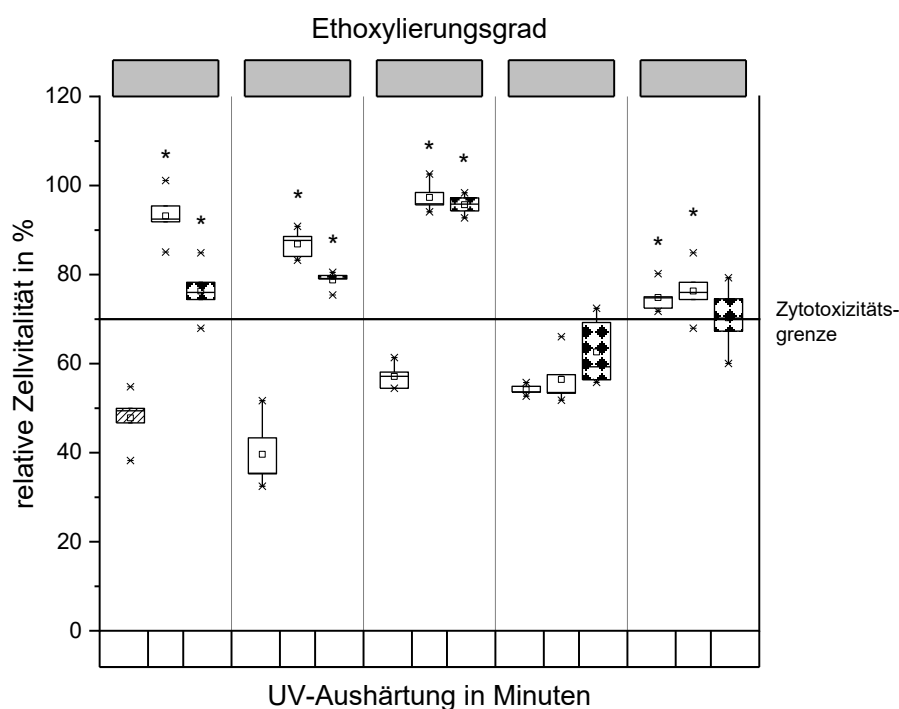


Abbildung 24: Vergleich der Zellproliferation bei Kontakt von Fibroblasten mit Eluaten gedruckter Probekörper mit unterschiedlichen Kettenlängen sowie UV-Nachbelichtungszeiten. Die Darstellung erfolgt als Boxplots mit $n=5$ und $*=p\leq 0,05$.

Die Untersuchung zeigt, dass sowohl die Kettenlänge als auch die UV-Nachbelichtung einen signifikanten Einfluss auf die Biokompatibilität haben. Bei nicht UV-belichteten Probekörpern mit Ethoxylierungsgraden von 2, 3, 4 und 10 sind zytotoxische Reaktionen zu sehen. Lediglich Probekörper mit einem Ethoxylierungsgrad von 30, der nicht UV-belichteten Probekörper, weisen einen Proliferationswert von mehr als 70 % referenziert auf die Negativkontrolle auf. Die Mittelwerte der Proliferation der Probekörper mit einem Ethoxylierungsgrad von 30 betragen 74,84 %, 76,30 % und 70,29 %. Es ist kein signifikanter Einfluss der UV-

Nachbelichtung innerhalb dieser Gruppe zu beobachten. Es wird davon ausgegangen, dass der maximal Vernetzungsgrad bereits durch die UV-Bestrahlung während des 3D-Drucks erreicht wird. Die anschließende UV-Belichtung scheint keine weiteren Vernetzungsreaktionen auszulösen. Die Werte liegen alle knapp über der Zytotoxizitätsgrenze, weshalb davon ausgegangen wird, dass bei längeren Elutionsdauern die relative Zellvitalität weiter sinkt.

Auch innerhalb der Gruppe der Probekörper mit einem Ethoxylierungsgrad von 10 kann kein signifikanter Einfluss der UV-Nachbelichtung auf die Biokompatibilität beobachtet werden. Weiterhin liegen alle Werte unterhalb der Zytotoxizitätsgrenze.

Bei den Probekörpern mit kürzeren Kettenlängen (Ethoxylierungsgrade 2, 3 und 4) sind signifikante Einflüsse der UV-Nachbelichtung auf die Biokompatibilität zu beobachten. Die Untersuchung zeigt deutlich, dass eine chemische Modifikation hin zu kürzeren Kettenlängen einen positiven Einfluss auf die Biokompatibilität der gedruckten Probekörper hat.

Tabelle 6: ANOVA: Tukey post-hoc Analyse der Einflüsse von Kettenlänge und UV-Aushärtezeit auf die relative Zellvitalität mit $*=p\leq 0,05$.

		0 min					2 min					4 min				
		EO2	EO3	EO4	EO10	EO30	EO2	EO3	EO4	EO10	EO30	EO2	EO3	EO4	EO10	EO30
0 min	EO2															
	EO3															
	EO4		*													
	EO10		*													
	EO30	*	*	*	*											
2 min	EO2	*	*	*	*	*										
	EO3	*	*	*	*	*										
	EO4	*	*	*	*	*										
	EO10		*			*	*	*	*							
	EO30	*	*	*	*		*	*	*	*						
4 min	EO2	*	*	*	*		*		*	*						
	EO3	*	*	*	*		*		*	*						
	EO4	*	*	*	*	*			*	*	*	*	*	*		
	EO10	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*		
	EO30	*	*	*	*		*	*	*	*				*		

6.4.2 Mechanische Untersuchungen

Mit Zugversuchen soll der Einfluss unterschiedlicher Kettenlängen auf die mechanischen Eigenschaften untersucht werden. Als zweiter Parameter wurde die der additiven Fertigung im 3D-Drucker folgende Aushärtezeit in der UV-Kammer variiert.

Auf Grund der Knappheit der modifizierten Photopolymer-Synthesen wurden für diesen Versuch nur die Synthesen mit dem minimalen Ethoxylierungsgrad von 2, mit dem maximalen Ethoxylierungsgrad von 30 sowie mit einem mittleren Ethoxylierungsgrad von 10 verwendet.

Herstellung und Vorbereitung der Probekörper

Für die Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften wurden in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 527-2 Zugprüfkörper verwendet. Es wurde der Zugprüfkörper-Typ 1BA mit einer Länge von 80 mm und einer Dicke von 2 mm verwendet. Die Abmaße sind in Abbildung 25 zu sehen.

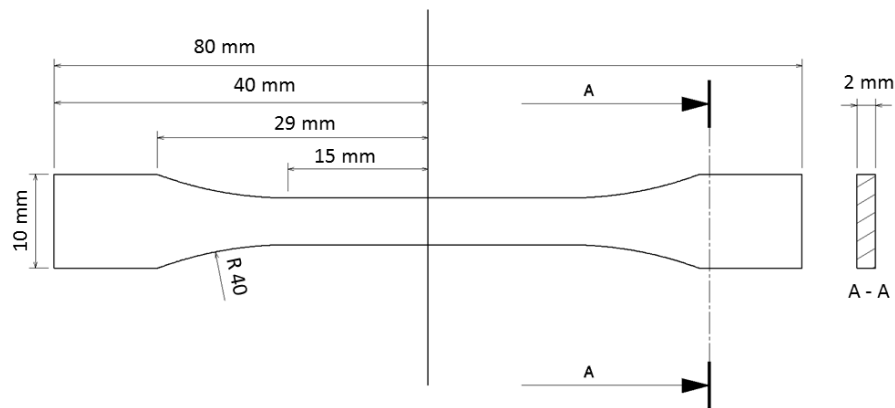


Abbildung 25: Zugprüfkörper-Typ 1BA in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 527-2 für Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften.

Die Probekörper für die mechanischen Untersuchungen wurden mit dem 3D-Drucker UV MAX (Asiga, Australien) mit einer Schichtdicke von 100 μm gedruckt. Die gedruckten Probekörper wurden händisch mit 99,8 %iger Ethanollösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) gereinigt, um anhaftendes Restphotopolymer zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Reinigung im Ultraschallbad Sonorex Super RK 255 H (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) mit ebenfalls 99,8% iger Ethanollösung für 10 Minuten. Nach der Reinigung wurden jeweils 5 Probekörper in der UV-Kammer CD-1 (pro3dure medical GmbH, Deutschland) für 0 Minuten, 4 Minuten und 8 Minuten unter Stickstoffatmosphäre ausgehärtet.

Bestimmung der mechanischen Eigenschaften

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der additiv gefertigten Probekörper aus den jeweiligen Synthesen wurden nach der Norm DIN EN ISO 527 Zugversuche durchgeführt. Verwendet wurde die Zugprüfmaschine Z 50 (Zwick GmbH & Co. KG, Deutschland). Die Prüfparameter sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Prüfparameter der durchgeführten Zugversuche.

Parameter und Einheit	Wert
Einspannlänge in mm	60
Vorkraft in MPa	0,2
Vorkraft Prüfgeschwindigkeit in mm/min	5
Prüfgeschwindigkeit in mm/min	5

Detektiert wurden von der Zugprüfmaschine die Längenänderung in % sowie die Spannungsänderung in MPa. Ausgewertet wurden jeweils die maximale Festigkeit in MPa, die maximale Dehnung in % sowie das E-Modul in MPa. Weiterhin wurde die Dauer der UV-Nachbelichtung variiert.

Ergebnis und Diskussion

Für die Auswertung wurden als statistische Größen der Minimal- und Maximalwert, Median, sowie das 25 % und 75 % Quantil ermittelt. Die Darstellung erfolgt über Boxplots mit $n=5$. Weiterhin wurde ein Tukey-post hoc Test durchgeführt, um die Mittelwerte aller Gruppen untereinander zu vergleichen. Die Darstellung erfolgt tabellarisch mit $*=p\leq 0,05$.

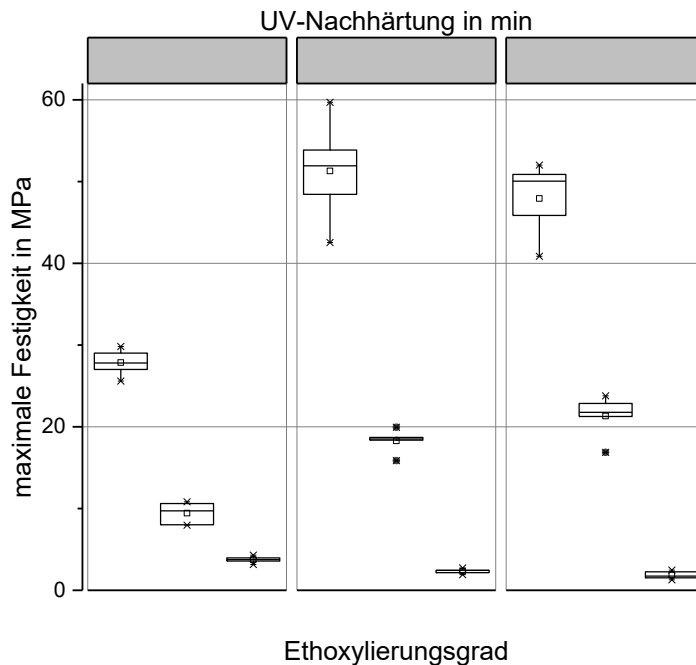


Abbildung 26: Vergleich der maximalen Festigkeit gedruckter Probekörper in Abhängigkeit der Kettenlängen (EO2, EO10 und EO30) und der UV-Aushärtezeit (0 min, 4 min und 8 min) dargestellt als Boxplot mit $n=5$.

Abbildung 26 zeigt die maximale Festigkeit gedruckter Probekörper aus Photopolymersynthesen mit den Ethoxylierungsgraden 2, 10 und 30. Ohne eine auf den Druck folgende UV-Nachbelichtung können bei gedruckten Probekörpern aus den Photopolymersynthesen mit Ethoxylierungsgraden von 2, 10 und 30 maximal Festigkeiten von 27,85 MPa, 9,43 MPa bzw. 3,75 MPa gemessen werden. Nach einer UV-Nachbelichtung von 4 Minuten kann bei den Zugprobekörpern gedruckt aus den Photopolymersynthesen mit Ethoxylierungsgraden 2 und 10 ein Anstieg der maximalen Festigkeit auf 51,29 MPa bzw. 18,28 MPa beobachtet werden. Bei den Zugprobekörpern gedruckt aus der Photopolymersynthese mit Ethoxylierungsgrad 30 sinkt die maximale Festigkeit auf 2,33 MPa. Eine Erhöhung der UV-Nachbelichtung auf 8 Minuten hat ein Absinken der maximalen Festigkeit der Zugprobekörper gedruckt aus der Photopolymersynthese mit einem Ethoxylierungsgrad von 2 auf 47,94 MPa zur Folge. Die maximale Festigkeit der Zugprobekörper gedruckt aus den Photopolymersynthesen mit einem Ethoxylierungsgrad von 10 steigt auf 21,31 Mpa, während die der Zugprobekörper gedruckt aus den Photopolymersynthesen mit einem Ethoxylierungsgrad von 30 auf 1,86 MPa sinkt. Tabelle 8 zeigt die Auswertung der Tukey post-hoc Analyse.

Tabelle 8: ANOVA: Tukey post-hoc Analyse der Einflüsse von Kettenlänge und UV-Aushärtezeit auf die maximale Festigkeit mit $*=p\leq 0,05$.

		0 min			4 min			8 min		
		EO2	EO10	EO30	EO2	EO10	EO30	EO2	EO10	EO30
0 min	EO2									
	EO10	*								
	EO30	*								
4 min	EO2	*	*	*						
	EO10	*	*	*	*					
	EO30	*	*		*	*				
8 min	EO2	*	*	*		*	*			
	EO10	*	*	*	*		*	*		
	EO30	*	*		*	*		*	*	

Die Auswertung der post-hoc Analyse zeigt, dass unabhängig von der UV-Nachbelichtungszeit eine Reduktion der Kettenlängen einen signifikanten Anstieg der maximalen Festigkeit mit sich bringt. Weiterhin ist zu erkennen, dass bei Probekörpern gedruckt aus Photopolymersynthesen mit Ethoxylierungsgraden von 2 und 10 eine 4-minütige UV-Nachbelichtung zu einer signifikanten Steigerung der maximalen Festigkeit führt. Eine Erhöhung der UV-Nachbelichtungszeit auf 8 Minuten hat bei diesen beiden Synthesen keinen weiteren signifikanten Einfluss auf die maximale Festigkeit. Bei Probekörpern gedruckt aus der Photopolymersynthese mit Ethoxylierungsgrad 30 hat die UV-Nachbelichtung keinen signifikanten Einfluss auf die maximale Festigkeit. Abbildung 27 zeigt die maximale Dehnung gedruckter Probekörper aus Photopolymersynthesen mit den Ethoxylierungsgraden 2, 10 und 30. Ohne UV-Nachbelichtung können bei gedruckten Probekörpern aus den

Photopolymersynthesen mit Ethoxylierungsgraden von 2, 10 und 30 maximale Dehnungen von 6,43 %, 21,01 % bzw. 34,98 % gemessen werden. Nach einer UV-Nachbelichtung von 4 Minuten kann bei den Zugprobekörpern gedruckt aus den Photopolymersynthesen mit Ethoxylierungsgraden 2 und 30 ein Rückgang der maximalen Dehnung auf 2,21 % bzw. 19,22 % beobachtet werden. Bei den Zugprobekörpern gedruckt aus der Photopolymersynthese mit Ethoxylierungsgrad 10 steigt die maximale Dehnung auf 24,44 %. Eine Erhöhung der UV-Nachbelichtung auf 8 Minuten hat ein Absinken der maximalen Dehnung der Zugprobekörper gedruckt aus den Photopolymersynthesen mit einem Ethoxylierungsgraden von 2 und 30 auf 2,12 %, bzw. 14,53 % zur Folge. Die maximale Dehnung der Zugprobekörper gedruckt aus der Photopolymersynthese mit einem Ethoxylierungsgrad von 10 steigt hingegen weiter auf 25,78 %.

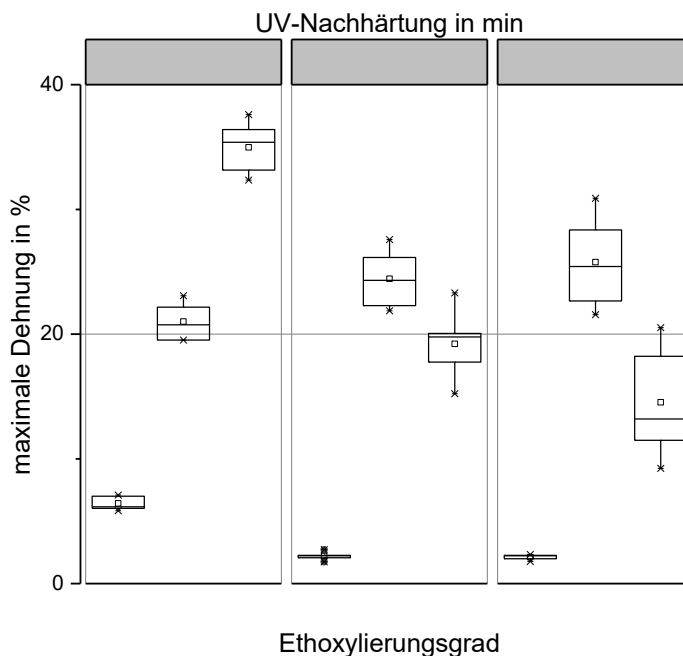


Abbildung 27: Maximale Dehnung in Abhängigkeit der Kettenlängen (EO2, EO10 und EO30) und der UV-Aushärtezeit (0 min, 4 min und 8 min) dargestellt als Boxplot mit n=5.

In Tabelle 9 ist die Auswertung der Tukey post-hoc Analyse. Die Auswertung der post-hoc Analyse zeigt, dass unabhängig von der UV-Nachbelichtungszeit die Verlängerung der Monomerketten zu einem signifikanten Anstieg der maximalen Dehnung führt. Weiterhin kann beobachtet werden, dass bei Probekörpern gedruckt aus Photopolymersynthesen mit Ethoxylierungsgraden von 2 und 10 die UV-Nachbelichtungszeit keinen signifikanten Einfluss auf die maximale Dehnung hat. Bei Probekörpern gedruckt aus der Photopolymersynthesen mit Ethoxylierungsgrad 30 ist durch die UV-Nachbelichtung eine signifikante Verringerung der maximalen Dehnung gegenüber nicht nachbehandelten Probekörpern zu beobachten.

Tabelle 9: ANOVA: Tukey post-hoc Analyse der Einflüsse von Kettenlänge und UV-Aushärtezeit auf die maximale Dehnung mit $*=p\leq 0,05$

	EO2_0min	EO10_0min	EO30_0min	EO2_4min	EO10_4min	EO30_4min	EO2_8min	EO10_8min	EO30_8min
EO2_0min									
EO10_0min	*								
EO30_0min	*	*							
EO2_4min		*	*						
EO10_4min	*		*	*					
EO30_4min	*		*	*					
EO2_8min		*	*		*	*			
EO10_8min	*		*	*		*	*		
EO30_8min	*	*	*	*	*		*	*	

Abbildung 28 zeigt die E-Moduln gedruckter Probekörper aus Photopolymersynthesen mit den Ethoxylierungsgraden 2, 10 und 30. Ohne UV-Nachbelichtung können bei gedruckten Probekörpern aus den Photopolymersynthesen mit Ethoxylierungsgraden von 2, 10 und 30 E-Moduln von 1160,22 MPa, 76,10 MPa bzw. 10,20 MPa gemessen werden. Nach einer UV-Nachbelichtung von 4 Minuten kann bei den Zugprobekörpern ein Anstieg des E-Moduls auf 3420,34 MPa, 205,06 MPa, bzw. 12,04 MPa beobachtet werden. Eine Erhöhung der UV-Nachbelichtung auf 8 Minuten hat einen weiteren geringen Anstieg der E-Moduln auf 3437,46 MPa, 268,92 MPa, bzw. 16,19 MPa zur Folge.

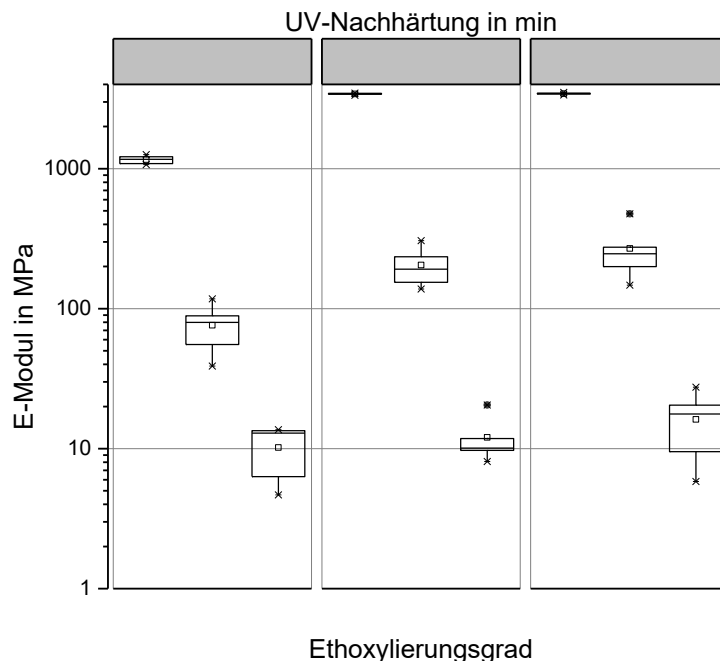


Abbildung 28: E-Modul in Abhängigkeit der Kettenlängen (EO2, EO10 und EO30) und der UV-Aushärtezeit (0 min, 4 min und 8 min) dargestellt als Boxplot mit logarithmischer Skalierung der y-Achse und $n=5$.

Tabelle 10 zeigt die Auswertung der Tukey post-hoc Analyse. Die Auswertung der post-hoc Analyse zeigt, dass gedruckte Probekörper aus der Photopolymersynthese mit einem Ethoxylierungsgrad von 2 unabhängig von der Dauer der UV-Nachbelichtungsdauer ein signifikant höheres E-Modul aufweisen als gedruckte Probekörper mit höheren Ethoxylierungsgraden und damit längeren Monomerketten. Weiterhin ist zu beobachten, dass bei gedruckten Probekörpern aus Photopolymersynthesen mit den Ethoxylierungsgraden 2 und 10 eine UV-Nachbelichtung von 4 Minuten zu einem signifikanten Anstieg des E-Moduls führt. Eine weitere Erhöhung der UV-Nachbelichtungszeit auf 8 Minuten hat keinen weiteren signifikanten Einfluss auf das E-Modul zur Folge.

Tabelle 10: ANOVA: Tukey post-hoc Analyse der Einflüsse von Kettenlänge und UV-Aushärtezeit auf das E-Modul mit $*=p\leq 0,05$.

	EO2_0min	EO10_0min	EO30_0min	EO2_4min	EO10_4min	EO30_4min	EO2_8min	EO10_8min	EO30_8min
EO2_0min									
EO10_0min	*								
EO30_0min	*								
EO2_4min	*	*	*						
EO10_4min	*	*	*	*					
EO30_4min	*			*	*				
EO2_8min	*	*	*		*	*			
EO10_8min	*	*	*	*		*	*		
EO30_8min	*			*	*		*	*	

6.5 Zusammenfassung und optimierte Photopolymersynthese

Zu Beginn dieses Kapitels wurde der Ist-Stand der biologischen Verträglichkeit des als Basis dienenden Photopolymers dieser Arbeit aufgezeigt. Es konnte deutlich beobachtet werden, dass es für Anwendungen mit einem Langzeitkontakt mit Zellen nicht geeignet ist, da es zu zytotoxischen Reaktionen kam.

Um das Photopolymer chemisch so zu modifizieren, dass es für die Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren eingesetzt werden kann, wurden zunächst mit Hilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie die Hauptbestandteile der herauslösbaren Substanzen aus gedruckten Probekörpern identifiziert. Dabei konnten Restmonomere als Hauptbestandteil identifiziert werden.

Um die Menge der herauslösbaren Restmonomere zu verringern, wurde das Photopolymer chemisch modifiziert. Es wurde angenommen, dass die Kettenlänge einen signifikanten Einfluss auf das Vernetzungsverhalten des Photopolymers und damit auch auf das Herauslösen von Bestandteilen hat. Weiterhin wurde angenommen, dass die Kettenlängen einen signifikanten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften gedruckter Bauteile haben können.

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Photopolymersynthesen mit unterschiedlichen Monomerkettenlängen erstellt. Zur Veränderung der Länge der Photopolymerketten wurden Oxyethylengruppen in die Ketten eingebracht. Je nach Anzahl eingebrachter Oxyethylengruppen wird von einem sog. Ethoxylierungsgrad gesprochen.

Zytotoxizitätsuntersuchungen zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen Kettenlängen, UV-Nachbelichtungszeit und zytotoxischen Eigenschaften. Es konnte beobachtet werden, dass Probekörper gedruckt aus Photopolymersynthesen mit kürzeren Monomerkettenlängen keine zytotoxischen Reaktionen hervorrufen. Weiterhin wurde die UV-Nachbelichtung als weiterer kritischer Faktor für zytotoxische Eigenschaften ausgemacht. So konnte gezeigt werden, dass diese zwingend notwendig ist, um die Monomerketten gedruckter Probekörper soweit zu vernetzen, dass keine Bestandteile in toxischen Konzentrationen herausgelöst werden können.

Zugversuche gedruckter Probekörper aus den unterschiedlichen Synthesen zeigten, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Längen der Monomerketten, der UV-Nachbelichtungszeit und den mechanischen Eigenschaften besteht. Lange Kettenlängen führen zu flexiblen Bauteilen, die keine hohen Festigkeiten aufwiesen. Um mechanisch stabile Bauteile zu erhalten, sind kurze Monomerketten sowie eine UV-Nachbelichtungszeit von **mindestens 4 Minuten** erforderlich.

Basierend auf den Ergebnissen der Zytotoxizitätsuntersuchungen sowie mechanischen Untersuchungen wurde ein optimiertes Photopolymer synthetisiert. Die Grundmonomere bestehen zu **80 % aus kurzkettigen Monomeren mit Ethoxylierungsgraden von 2,3 und 4**, um dem Photopolymer seine mechanischen Eigenschaften zu verschaffen und die Menge der herauslösbaren Bestandteile zu reduzieren. Weiterhin beinhaltet das Photopolymer **20 % Monomerketten mit einem Ethoxylierungsgrad von 10**, um die gedruckten Bauteile nicht zu spröde werden zu lassen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden verschiedene Experimente hinsichtlich der biologischen Verträglichkeit mit unterschiedlichen Zellen, dem Einfluss der Orientierung der Probekörper im 3D-Drucker, der Beständigkeit gegenüber Heißdampfsterilisation sowie dem Anwachsverhalten von Zellen auf gedruckten Proben durchgeführt.

7 Experimente mit optimiertem Photopolymer

Im bisherigen Teil der Arbeit konnte aufgezeigt werden, welche Bestandteile sich aus gedruckten Probekörpern herauslösen und wie das Photopolymer chemisch zu modifizieren ist, um es für die Herstellung von zertifizierbaren Bioreaktoren einsetzen zu können. Im Folgenden sollen mit dem optimierten Photopolymer Experimente zur Validierung der Erzielung der Anforderungen durchgeführt werden. Dazu wurden folgende Experimente geplant:

- Mechanische Untersuchung des optimierten Photopolymers
- Zytotoxizitätsuntersuchungen mit drei unterschiedlichen Zelltypen
- Untersuchung der Beständigkeit gegenüber Heißdampfsterilisation
- Nachbehandlungsmethoden zur definierten Erzeugung transparenter Stellen
- Direktbesiedelung gedruckter Probekörper mit Fibroblasten

7.1 Herstellung der Probekörper für die Experimente

Die Probekörper für sämtlichen Experimente wurden mit dem 3D-Drucker ASIGA UV MAX (Asiga, Australien) mit einer Schichtdicke von 100 µm gedruckt. Die gedruckten Probekörper wurden händisch mit 99,8 %iger Ethanollösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) gereinigt, um anhaftendes Restphotopolymer zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Reinigung in dem Ultraschallbad Sonorex Super RK 255 H (Firma BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) mit ebenfalls 99,8% iger Ethanollösung für 10 Minuten. Nach der Reinigung wurden die Probekörper in der UV-Kammer CD-1 (pro3dure medical GmbH, Deutschland) für 4 Minuten unter Stickstoffatmosphäre ausgehärtet.

7.2 Mechanische Untersuchungen des optimierten Photopolymers

Die mechanischen Untersuchungen wurden in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 527 durchgeführt. Weiterhin wurden Zielanforderungen definiert, die eine mechanische Stabilität der gedruckten Produkte gewährleisten. Dazu wurde sich an technischen Datenblättern von bereits verwendeten Kunststoffen für die Herstellung von Bioreaktoren orientiert. So wurden die in Tabelle 11 abgebildeten Anforderungen an die minimale Festigkeit und die minimale Dehnung festgelegt.

Tabelle 11: Zielanforderungen an die mechanischen Eigenschaften gedruckter Probekörper aus dem optimierten Photopolymer.

Parameter und Einheit	Wert
Maximale Festigkeit in MPa	25
Maximale Dehnung in %	1

Hypothese

Die Hypothese dieses Experiments bezieht sich auf den Vergleich der mechanischen Eigenschaften der gedruckten Probekörper mit den definierten Zielanforderungen.

- Nullhypothese H_0 : Die mechanischen Eigenschaften gedruckter Probekörper sind geringer als die gestellten Zielanforderungen.
- Alternativhypothese H_1 : Die mechanischen Eigenschaften sind höher als die gestellten Zielanforderungen.

Herstellung und Orientierung der Probekörper

Zur Untersuchung des Einflusses der Orientierung der Probekörper im Bauraum des 3D-Druckers wurden jeweils 5 Zugprüfkörper in den drei verschiedenen Raumrichtungen orientiert hergestellt (vgl. Abbildung 29).

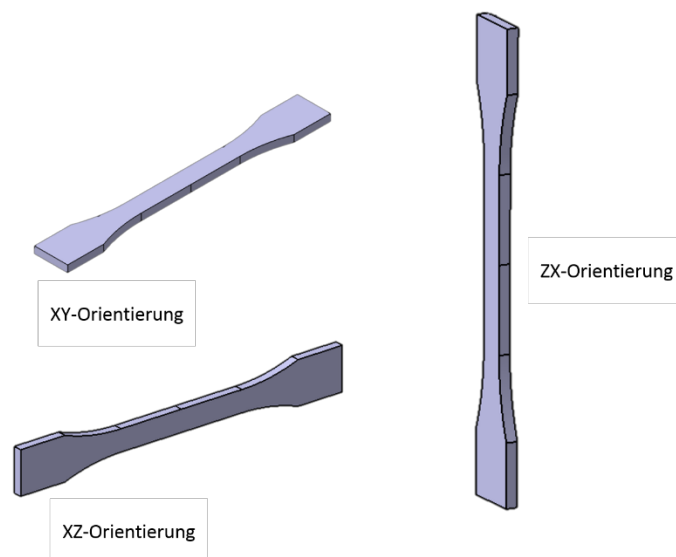


Abbildung 29: Orientierung der Probekörper in den drei Baurichtungen.

Bestimmung der mechanischen Eigenschaften

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der additiv gefertigten Probekörper aus den jeweiligen Synthesen wurden nach der Norm DIN EN ISO 527 Zugversuche durchgeführt. Verwendet wurde die Zugprüfmaschine Z 50 (Zwick GmbH & Co. KG, Deutschland). Die Prüfparameter sind Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: Prüfparameter der durchgeführten Zugversuche.

Parameter und Einheit	Wert
Einspannlänge in mm	60
Vorkraft in MPa	0,2
Vorkraft Prüfgeschwindigkeit in mm/min	5
Prüfgeschwindigkeit in mm/min	5

Detektiert wurden von der Zugprüfmaschine die Längenänderung in % sowie die Spannungsänderung in MPa. Ausgewertet wurden jeweils die maximale Festigkeit in MPa sowie die maximale Dehnung in %.

Ergebnisse und Diskussion

Für die Auswertung wurden als statistische Größen der Minimal- und Maximalwert, Median, sowie das 25 % und 75 % Quantil ermittelt. Die jeweiligen Werte innerhalb einer Gruppe wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf ihre Normalverteilung überprüft. Eine Normalverteilung konnte in keinem der Fälle zurückgewiesen werden. Mit Hilfe des t-Tests wurden die Mittelwerte der Gruppen gegenüber den Testmittelwerten 1 % (Dehngrenze) sowie 25 MPa (Festigkeit) untersucht. Die Darstellung erfolgt über Boxplots mit $n=5$ und $*=p\leq 0,05$.

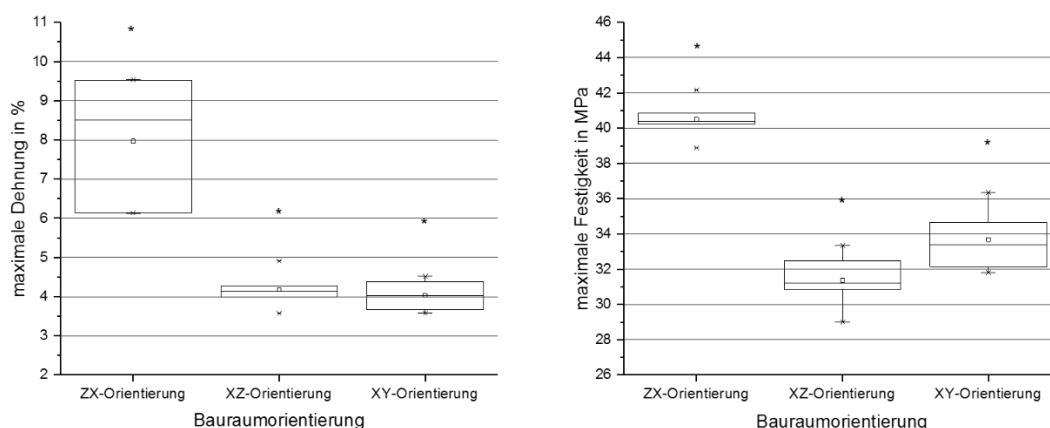


Abbildung 30: Maximale Dehnung (links) und maximale Festigkeit (rechts) additive gefertigter Probekörper in Abhängigkeit der Bauraumorientierung dargestellt als Boxplot, mit $n=5$ und $*=p\leq 0,05$.

Bei gedruckten Probekörpern in ZX-Orientierung kann eine maximale Dehnung von 7,97 % gemessen werden. In XZ-Orientierung bzw. in XY-Orientierung gedruckte Probekörper erreichen maximale Dehnungen von 4,18 % bzw. 4,03 %. Alle Probekörper weisen signifikant höhere Dehnwerte auf als die Zielforderungen vorgeben. Die maximale Festigkeit bei in ZX-

Orientierung gedruckten Probekörper beträgt 40,50 MPa. Bei in XZ-Orientierung bzw. in XY-Orientierung gedruckten Probekörpern können maximale Festigkeiten von 31,38 MPa bzw. 33,67 MPa gemessen werden. Alle Probekörper weisen somit signifikant höhere Festigkeiten auf als die der Zielvorgabe. Allgemein kann beobachtet werden, dass die mechanischen Eigenschaften bei in ZX-Orientierung gedruckten Probekörpern am höchsten sind.

7.3 Beständigkeit gegenüber Heißdampfsterilisation

Die Heißdampfsterilisation wird als sinnvollste Methode angesehen, um 3D-gedruckte Produkte zu sterilisieren, da sie günstig und für kleine Stückzahlen geeignet ist. Weiterhin ist sie nahezu in jeder Klinik oder jedem Labor zugänglich, sodass eine „Point-of-care“-Produktion, also eine Produktion direkt am Ort des Einsatzes, möglich ist.

Im Rahmen dieses Experiments soll die Beständigkeit gedruckter Probekörper gegenüber der Heißdampfsterilisation untersucht werden. Dazu sollen die mechanischen Eigenschaften von sterilisierten Zugprobekörpern mit nicht sterilisierten Probekörpern verglichen werden.

Hypothese

Die Hypothese dieses Experiments bezieht sich auf den Vergleich der mechanischen Eigenschaften sterilisierter Zugprobekörper mit nicht sterilisierten Referenzprobekörpern.

- Nullhypothese H_0 : Die mechanischen Eigenschaften heißdampfsterilisierter Zugprobekörper sind geringer als die nichtsterilisierter Referenzprobekörper.
- Alternativhypothese H_1 : Die mechanischen Eigenschaften heißdampfsterilisierter Zugprobekörper sind höher als die nichtsterilisierter Referenzprobekörper.

Fertigung der Probekörper und Sterilisation

Zur Untersuchung der Beständigkeit gegenüber Heißdampfsterilisation wurden Zugprobekörper in den drei Raumorientierungen analog zu den Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften gedruckt. Die Probekörper wurden anschließend in Sterilisationsbeutel verpackt und mit dem Autoklaven Hospiklav 25-Typ B (SHP Steriltechnik AG, Deutschland) bei 121 °C für 15 Minuten heißdampfsterilisiert.

Anschließend wurden Zugversuche analog zu den Zugversuchen zur Ermittlung der mechanischen Eigenschaften durchgeführt (vgl. Kapitel 6.4.2).

Ergebnisse und Diskussion

Für die Auswertung wurden als statistische Größen der Minimal- und Maximalwert, Median, sowie das 25 % und 75 % Quantil ermittelt. Die jeweiligen Werte innerhalb einer Gruppe wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf ihre Normalverteilung überprüft. Eine Normalverteilung konnte in keinem der Fälle zurückgewiesen werden. Mit Hilfe des t-Tests wurden die Mittelwerte heißdampfsterilisierter und nicht sterilisierter Probekörper innerhalb der drei Gruppen jeweils gegeneinander verglichen. Die Darstellung erfolgt über Boxplots mit $n=5$ und $*=p\leq 0,05$. Abbildung 31 zeigt die Gegenüberstellung der maximalen Festigkeit heißdampfsterilisierter Zugprobekörper und nicht sterilisierter Referenzprobekörper.

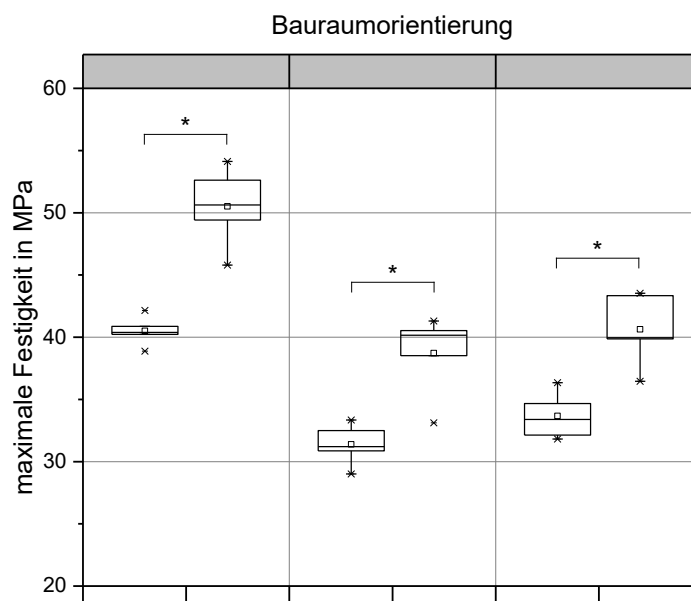


Abbildung 31: Vergleich der maximalen Festigkeit von heißdampfsterilisierten Zugprobekörpern und nicht sterilisierten Referenzprobekörpern dargestellt als Boxplot, mit $n=5$ und $*=p\leq 0,05$.

Die maximale Festigkeit heißdampfsterilisierter Zugprobekörper in ZX-Orientierung gedruckt beträgt 50,52 MPa. Gegenüber nicht sterilisierten Referenzprobekörpern kann somit ein signifikanter Anstieg um 24,7 % beobachtet werden. Sterilisierte Probekörper gedruckt in XZ-Orientierung bzw. XY-Orientierung weisen maximale Festigkeiten von 38,72 MPa bzw. 40,63 MPa auf. Auch sie weisen somit einen signifikanten Anstieg der maximalen Festigkeit auf. Dieser beträgt 23,4 % bzw. 20,7 %. Es wird davon ausgegangen, dass durch den Temperatureinfluss während der Heißdampfsterilisation eine Nachvernetzung der Probekörper erfolgt. Die stärkere Vernetzung der Polymerketten hat einen Anstieg der maximalen Festigkeit zur Folge.

Abbildung 32 zeigt die Gegenüberstellung der maximalen Dehnung heißdampfsterilisierter Zugprobekörper und nicht sterilisierter Referenzprobekörper.

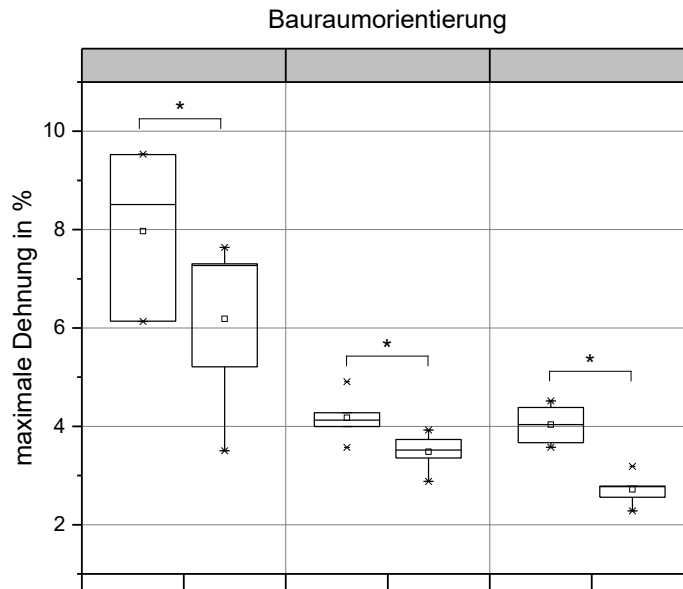


Abbildung 32: Vergleich der maximalen Dehnung von heißdampfsterilisierten Zugprobekörpern und nicht sterilisierten Referenzprobekörpern dargestellt als Boxplot, mit $n=5$ und $*=p \leq 0,05$.

Die maximale Dehnung heißdampfsterilisierter Zugprobekörper in ZX-Orientierung gedruckt beträgt 6,19 %. Gegenüber nicht sterilisierten Referenzprobekörpern kann somit eine signifikante Reduktion um 22,3 % beobachtet werden. Sterilisierte Probekörper gedruckt in XZ-Orientierung bzw. XY-Orientierung weisen maximale Dehnungen von 3,48 % bzw. 2,72 % auf. Auch sie weisen somit eine signifikante Reduktion der maximalen Dehnung auf. Diese beträgt 16,7 % bzw. 32,7 %. Es wird davon ausgegangen, dass die stärkere Vernetzung durch den Temperatureinfluss während der Heißdampfsterilisation einen Rückgang der maximalen Dehnung zur Folge hat. Gegenüber der in der Zielstellung geforderten maximalen Dehnung von 1 % weisen alle Probekörper dennoch einen signifikant höheren Wert auf.

Das Experiment zeigt, dass nach einer Sterilisation mittels Heißdampfs gedruckte Probekörper aus dem optimierten Photopolymer die geforderten Anforderungen erfüllen. Eine Behandlung mittels Heißdampfs kann somit als geeignete Sterilisationsmethode angesehen werden.

7.4 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Zur Validierung des optimierten Photopolymers wurden Zytotoxizitätsuntersuchungen nach Elutionszeiten von 7 Tagen, 14 Tagen sowie 30 Tagen mit drei unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt:

- Fibroblasten (Hs27)
- Osteoblasten (SAOS-2)
- Endothelzellen (HUVEC)

Hypothese

Die Hypothese dieses Experiments bezieht sich auf die Beobachtung von zytotoxischen Eigenschaften nach unterschiedlichen Elutionszeiten gedruckter Probekörper des optimierten Photopolymers.

- Nullhypothese H_0 : Nach den jeweiligen Elutionszeiten können zytotoxische Reaktionen beobachtet werden.
- Alternativhypothese H_1 : Nach den jeweiligen Elutionszeiten können keine zytotoxischen Reaktionen beobachtet werden.

Können nach den jeweiligen Elutionszeiten bei keiner der unterschiedlichen Zelllinien zytotoxische Reaktionen beobachtet werden, wird das optimierte Photopolymer für diesen Zeitraum als geeignet angesehen. Ab einem Elutionszeitraum von 30 Tagen wird das optimierte Photopolymer als geeignet für den dauerhaften Einsatz angesehen.

Kultivierung der Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien für die Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden im Inkubator CB 150 (Binder GmbH, Deutschland) bei 37 °C und 10 % CO_2 -Gehalt kultiviert. Als Kultivierungsmedium wurden für die jeweiligen Zelllinien unterschiedliche Zellkulturmedien verwendet. Für die Zelllinien SAOS-2 (Osteoblasten) sowie HUVEC (Endothelzellen) wurden als Basis kommerziell erwerbliche Fertigmedien verwendet. Die Fertigmedien waren jedoch so ausgelegt, dass sie bei einem CO_2 -Gehalt von 5 % den für die Zellen optimalen pH-Wert von 7,4 aufwiesen. Um bei einem CO_2 -Gehalt von 10 % den optimalen pH-Wert aufzuweisen, musste den Medien Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) beigemischt werden. Die benötigte Menge wurde mit Hilfe der modifizierten Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet (Gstraunthaler et al. 2013):

$$pH = 6,1 + \log\left(52 \cdot \frac{NaHCO_3 \left[\frac{g}{l}\right]}{CO_2 [\%]} - 1\right) \quad (8)$$

Die Berechnung ergibt, dass die Konzentration von Natriumhydrogencarbonat $4,03 \frac{g}{l}$ betragen muss. Zur Modifizierung der Zellkulturmedien wurde eine Natriumhydrogencarbonat-Lösung mit einer Konzentration von $75 \frac{g}{l}$ verwendet.

Für die Kultivierung der SAOS-2 Zelllinie wurde als Basismedium Mc Coy's 5A (Biochrom GmbH, Deutschland) verwendet. Das Medium beinhaltet $2,2 \frac{g}{l}$ Natriumhydrogencarbonat, sodass weitere $1,83 \frac{g}{l}$ beigemischt werden mussten. Um optimale Kultivierungsbedingungen zu erhalten, wurden zusätzlich weitere Bestandteile hinzugefügt. Tabelle 13 zeigt alle Bestandteile des verwendeten Zellkulturmediums:

Tabelle 13: Zusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums für SAOS-2 Zellen.

Beschreibung	Volumen in ml
Mc Coy's 5A Medium	500
L-glutamine (2mM)	5,6
Fetal bovine serum (FBS)	54,4
Penicillin-Streptomycin	5
Amphotericin B	5
Natriumhydrogencarbonat	12,2

Für die Kultivierung der HUVEC Zelllinie wurde ein „ready-to-use“ Medium (Cat No. 211-500, Cell Applications Inc., USA bezogen über Sigma Aldrich) verwendet. Das Medium beinhaltet $1,76 \frac{g}{l}$ Natriumhydrogencarbonat, sodass weitere $2,27 \frac{g}{l}$ beigemischt werden mussten.

Für die Kultivierung der Hs27 Zelllinie wurde das Fertigmedium Dulbecco's MEM (Biochrom GmbH, Deutschland) verwendet.

Vorbereitung der Probekörper und Referenzen

Für die Durchführung der Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden viereckige Probekörper mit den Maßen 50 mm x 10 mm x 1 mm wie in Kapitel 7.1 beschrieben hergestellt. Als Positivkontrolle wurden Kupferplättchen in denselben Maßen vorbereitet. Alle Probekörper wurden in Sterilisationsbeutel verpackt und mit dem Autoklaven Hospiklav 25-Typ B (SHP Steriltechnik AG, Deutschland) bei 121 °C für 15 Minuten heißdampfsterilisiert. Die Probekörper weisen jeweils eine Oberfläche von 11,2 cm² auf.

Herstellung der Eluate

Die Herstellung der Eluate erfolgte nach der Norm DIN EN ISO 10993-12. Für die Experimente mit den unterschiedlichen Zelllinien wurde das jeweilige Zellkulturmedium als Extraktionsmedium verwendet. Die Experimente wurden je Zelllinie und je Elutionsdauer in 5-facher Ausführung (n=5) durchgeführt.

Unter einer Sterilwerkbank wurden dazu 5-mal je 3 der vorbereiteten Probekörper mit Hilfe einer sterilen Pinzette in ein steriles 15 ml Flacon Tube überführt. Um das in der Norm geforderte Extraktionsverhältnis von $3 \frac{cm^2}{ml}$ zu erfüllen, wurden in jedes Falcon Tube 11,2 ml des jeweiligen Zellkulturmediums gegeben. Als Positivkontrolle dienten die vorbereiteten Kupferplättchen, deren Extrakte auf dieselbe Weise vorbereitet wurden. Als Negativkontrolle wurde 11,2 ml reines Zellkulturmedium in ein Falcon Tube gegeben.

Alle Proben wurden anschließend in einem Inkubator bei 37 °C und 10 % CO₂-Gehalt für die Elutionszeiten von 7 Tagen, 14 Tagen sowie 30 Tagen inkubiert.

Durchführung der Zytotoxizitätsuntersuchungen

Zur Untersuchung der zytotoxischen Eigenschaften wurden WST-8 Tests in 96er-Well-Plates (Mikrotiterplatte) durchgeführt. Einen Tag vor dem Zusammenbringen von Zellen und Eluaten wurden unter einer Sterilwerkbank in 35 der 96 Wells einer Mikrotiterplatte 100 µl einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von $5000 \frac{Zellen}{cm^2}$ pipettiert (vgl. Abbildung 33).

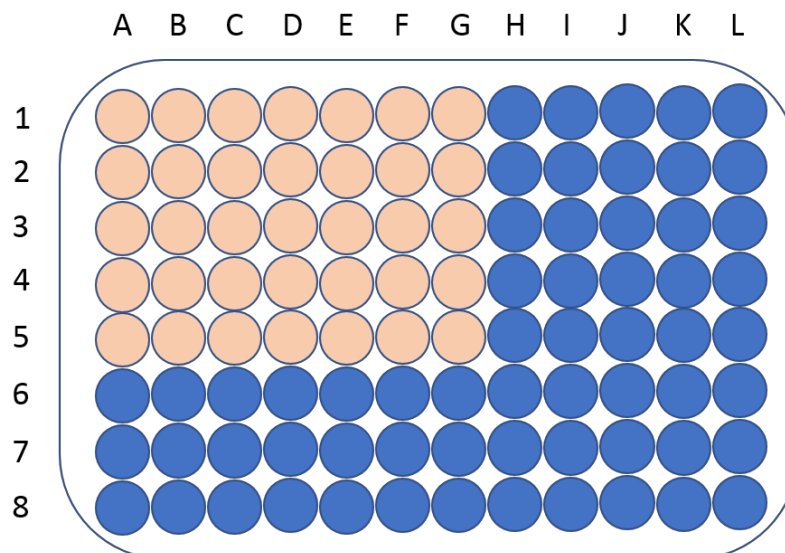


Abbildung 33: Schematische Darstellung der mit Zellen besiedelten Wells für die Experimente zur Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften.

Anschließend wurde die besiedelte Mikrotiterplatte für 24 Stunden bei 37 °C und 10 % CO₂-Gehalt inkubiert, sodass die Zellen adhären konnten. Nach der Inkubation wurde das Zellkulturmedium unter einer Sterilwerkbank vorsichtig abgesaugt und in die Wells A 1-5 bis E 1-5 jeweils 100 µl aus je einem der 5 Eluate der gedruckten Probekörper pipettiert. In die Wells F 1-5 wurde jeweils 100 µl der Eluate der Positivkontrolle (Kupfereluat) sowie in die Wells G 1-5 100 µl der Negativkontrolle gegeben. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation für 72 Stunden.

Im Anschluss an die Inkubation wurden erneut unter einer Sterilwerkbank die Elutionslösungen abgesogen und 100 µl einer WST-Zellkulturmedium-Suspension (Verhältnis 1:10) in die jeweiligen Wells gegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 1 Stunde wurde in einem Photometer die Absorption bei den Wellenlängen von 450 nm sowie 620 nm gemessen. Die gemessenen Werte wurden auf die Negativkontrolle referenziert und so die relative Zellvitalität bestimmt.

Der Versuch wurde für jede Elutionsdauer und jede Zelllinie wiederholt, sodass insgesamt 9 Experimente durchgeführt wurden.

Ergebnisse und Diskussion

Die Auswertung erfolgte nach der Norm DIN EN ISO 10993-5. Ein Rückgang der Proliferationsrate von über 30 % referenziert auf die Negativkontrolle wird als zytotoxische Reaktion bewertet.

Für die Auswertung wurden als statistische Größen der Minimal- und Maximalwert, Median, sowie das 25 % und 75 % Quantil ermittelt. Die jeweiligen Werte innerhalb einer Gruppe wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf ihre Normalverteilung überprüft. Eine Normalverteilung kann in keinem der Fälle zurückgewiesen werden. Mit Hilfe des t-Tests wurden die Mittelwerte der Gruppen gegenüber dem Testmittelwert 70 % (Zytotoxizitätsgrenze) verglichen. Die Darstellung erfolgt über Boxplots mit $n=5$ und $*=p\leq 0,05$.

Abbildung 34 zeigt die relative Zellproliferation referenziert auf die Negativkontrolle der jeweiligen Zelllinien in Abhängigkeit der drei Elutionszeiten von 7 Tagen, 14 Tagen sowie 30 Tagen.

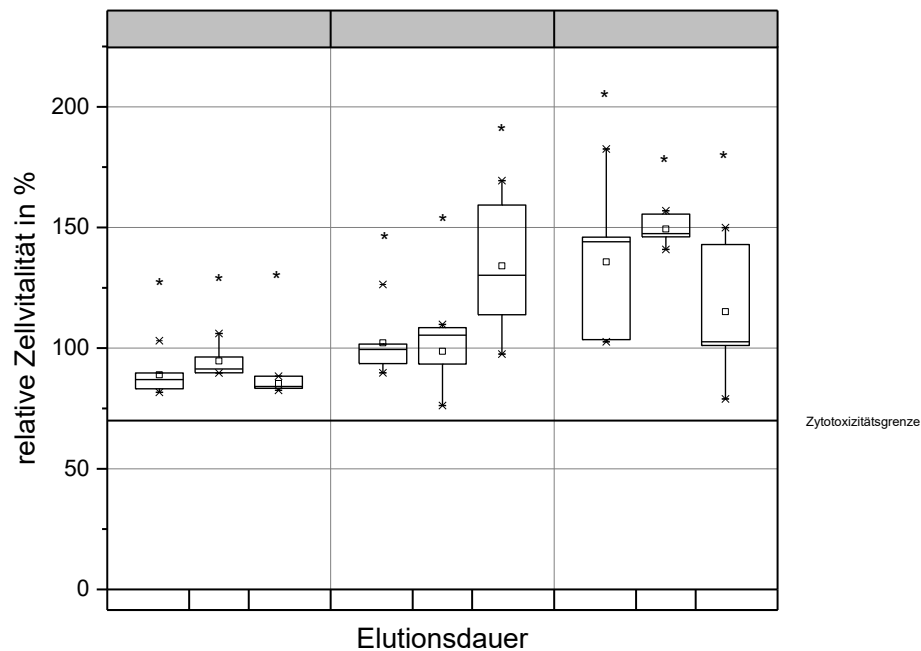


Abbildung 34: Relative Zellvitalität unterschiedlicher Zelllinien nach Elutionsdauer von 7, 14 und 30 Tagen dargestellt als Boxplot, mit $n=5$ und $*=p\leq 0,05$.

Nach einer Elutionsdauer von 7 Tagen wird eine relative Zellvitalität der Hs27-Zellen von 88,92 % beobachtet. Nach Elutionszeiten von 14 Tagen bzw. 30 Tagen kann eine relative Zellvitalität von 94,65 % bzw. 85,33 % gemessen werden. SAOS-2-Zellen weisen nach einer Elutionsdauer von 7 Tagen eine relative Zellvitalität von 102,17 % auf. Nach Elutionszeiten von 14 Tagen bzw. 30 Tagen kann eine relative Zellvitalität von 98,66 % bzw. 134,07 % beobachtet werden. HUVEC-Zellen weisen nach einer Elutionsdauer von 7 Tagen eine relative Zellvitalität von 135,75 % auf. Nach Elutionszeiten von 14 Tagen bzw. 30 Tagen kann eine relative Zellvitalität von 149,37 % bzw. 115,12 % beobachtet werden.

Die Auswertung zeigt, dass mit allen Eluatensätzen der gedruckten Probekörper des optimierten Photopolymers signifikant höhere Zellvitalitätswerte als die Zytotoxizitätsgrenze von 70 % beobachtet werden können. Das optimierte Photopolymer wird somit als biokompatibel angesehen und ist für den dauerhaften Kontakt mit Zellen geeignet.

7.5 Experimente zur Oberflächenbehandlung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich als Ziel definiert, durch eine geeignete Oberflächenbehandlung transparente Bereiche zu schaffen, um so beispielsweise Zellen direkt durch gedruckte Probekörper mit Hilfe eines Mikroskops beobachten zu können.

Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Beschichtungsverfahren untersucht und die Auswirkung auf die Transparenz der Probekörper im Rahmen eines Experimentes untersucht. Weiterhin hat die Beschaffenheit der Oberfläche einen Einfluss auf die Benetzbarkeit dieser. Hierzu wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt.

7.5.1 Experiment zur Transparenz

Ziel des Experimentes war es durch eine geeignete Oberflächenbehandlung transparente Bereiche auf den sonst trüben und nicht transparenten Probekörpern zu erzeugen. Zusätzlich sollte die Abhängig der Bauraumorientierung während des Drucks sowie unterschiedliche Dicken der Probekörper beachtet werden. Die trübe Oberfläche ist auf den bereits in dieser Arbeit beschriebenen Sauerstoffinhibitionseffekt zurückzuführen. Weiterhin kann eine nicht glatte Oberfläche zu Lichtbrechungen führen, die eine Transparenz verhindern. Durch das Aufbringen einer Beschichtung im flüssigen Zustand und eine Aushärtung dieser in einer UV-Kammer unter Stickstoff-Atmosphäre soll dies verhindert werden.

Hypothese

Die Hypothese dieses Experiments bezieht sich auf den Vergleich Oberflächen-behandelter und nicht Oberflächen-behandelter Probekörper.

- Nullhypothese H_0 : Mit Hilfe einer Oberflächenbehandlung gelingt es nicht transparente Bereiche auf gedruckten Probekörpern zu erzeugen.
- Alternativhypothese H_1 : Mit Hilfe einer Oberflächenbehandlung gelingt es transparente Bereiche auf gedruckten Probekörpern zu erzeugen.

Die Auswertung des Experiments wurde qualitativ durchgeführt.

Herstellung der Probekörper

Zur Untersuchung der Transparenz wurden runde Probekörper mit einem Durchmesser von 25 mm wie in Kapitel 7.1 beschrieben gedruckt. Dabei wurde zwischen einer horizontalen und vertikalen Positionierung im Bauraum unterschieden, sodass sowohl glatte Probekörper als auch Probekörper mit einer Riffelung (im Abstand der gewählten Schichtbaustärke von 100 μm) auf der Oberfläche vorhanden waren. Bei den Probekörpern gedruckt in horizontaler Richtung wurde darauf geachtet, möglichst wenige Stützstrukturen auf der später zu untersuchenden Oberfläche anzuordnen. Weiterhin wurden Probekörper in unterschiedlichen

Dicken, 1 mm, 2 mm sowie 3 mm, hergestellt. Als Oberflächenbehandlung wurde eine Beschichtung mittels Tröpfchen gewählt. Als Beschichtungsmittel wurde das flüssige optimierte Photopolymer verwendet. Dazu wurden mit Hilfe der Spritzenpumpe KDS 272 CE (KD Scientific Inc., USA) 10 Tropfen bei einer konstanten Förderrate von $600 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$ auf die Oberfläche des Probekörpers pipettiert und dort verlaufen gelassen. Anschließend erfolgte eine erneute Aushärtung der Probekörper in der UV-Kammer für 4 Minuten unter Stickstoffatmosphäre. Der Vorgang wurde für beide Seiten des Probekörpers durchgeführt. Für das Experiment standen somit folgende Probekörpertypen, jeweils in den Dicken 1 mm, 2 mm sowie 3 mm, zur Verfügung:

- Horizontal gedrucktes unbehandeltes Plättchen
- Vertikal gedrucktes unbehandeltes Plättchen
- Horizontal gedrucktes behandeltes Plättchen
- Vertikal gedrucktes behandeltes Plättchen

Durchführung

Ziel war es vitale Zellen durch die gedruckten Probekörper mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops Axiovert 40CFL (Zeiss, Deutschland) visuell zu beobachten. Dazu wurden Zellen der Zelllinie Hs27 in T25 Zellkulturfläschchen bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellkulturfläschchen wurden auf die gedruckten Probekörper gelegt und mit Hilfe des Mikroskops durch die gedruckten Probekörper visuell untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 35 zeigt Mikroskopaufnahmen durch horizontal gedruckte und nicht oberflächenbehandelte Probekörper mit einer Dicke von 1 mm.

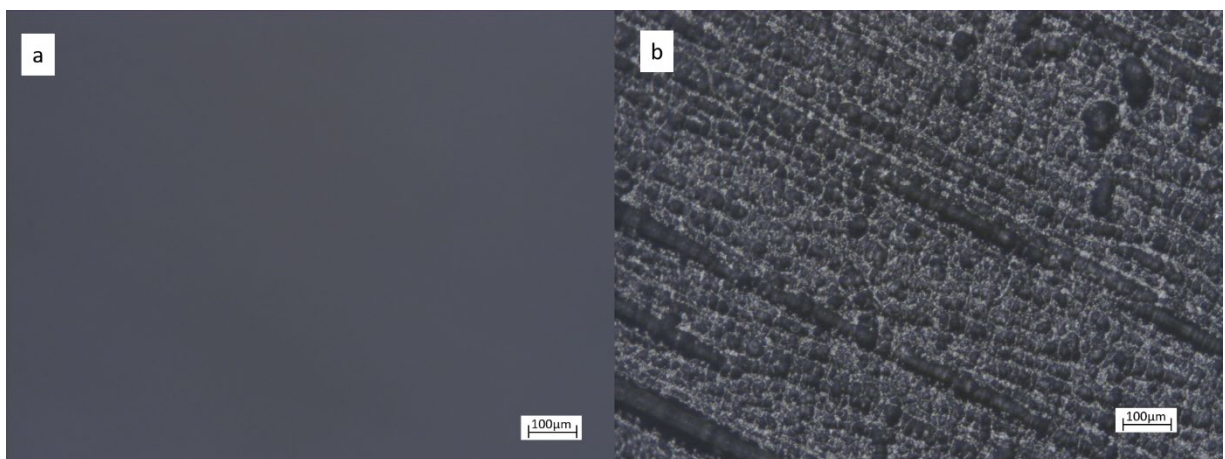


Abbildung 35: Mikroskopaufnahmen durch horizontal gedruckte und nicht oberflächenbehandelte Probekörper mit einer Dicke von 1 mm.

Auf der linken Seite (Bild a) ist zu sehen, dass keine Zellen fokussiert werden können und somit eine visuelle Untersuchung von Zellen durch diesen Probekörper nicht möglich ist. Durch Änderung des Fokus kann die Oberfläche des Probekörpers gesehen werden (linke Seite, Bild b). Es ist deutlich eine Strukturierung der Oberfläche zu erkennen. Es wird vermutet, dass diese durch die Oberfläche der Folie, durch die die UV-Bestrahlung während des Druckes geschieht, an den Probekörper bedingt wird.

Abbildung 36 zeigt Mikroskopaufnahmen durch horizontal gedruckte und nicht oberflächenbehandelte Probekörper mit einer Dicke von 1 mm.

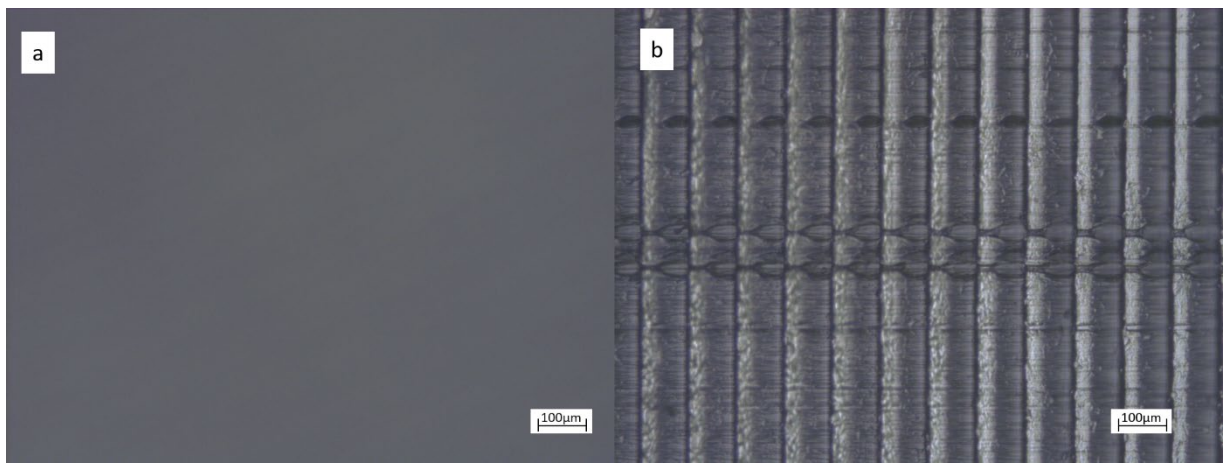


Abbildung 36: Mikroskopaufnahmen durch vertikal gedruckte und nicht oberflächenbehandelte Probekörper mit einer Dicke von 1 mm.

Wie bei den horizontal gedruckten und nicht oberflächenbehandelten Probekörpern ist zu sehen, dass keine Zellen fokussiert werden können und somit eine visuelle Untersuchung von Zellen durch diesen Probekörper nicht möglich ist (linke Seite, Bild a). Bei Fokussierung auf die Oberfläche, ist deutlich die Strukturierung durch den schichtweisen Aufbau der Probekörper zu sehen.

Abbildung 37 zeigt Mikroskopaufnahmen durch horizontal gedruckte und oberflächenbehandelte Probekörper mit Dicken von 1 mm und 3 mm. Bei einer Dicke von 1 mm (linke Seite) sind Fibroblasten deutlich durch die horizontal gedruckten und oberflächenbehandelten Probekörper zu sehen. Auch bei einer Dicke von 3 mm (rechte Seite) sind die Zellen noch deutlich sichtbar.

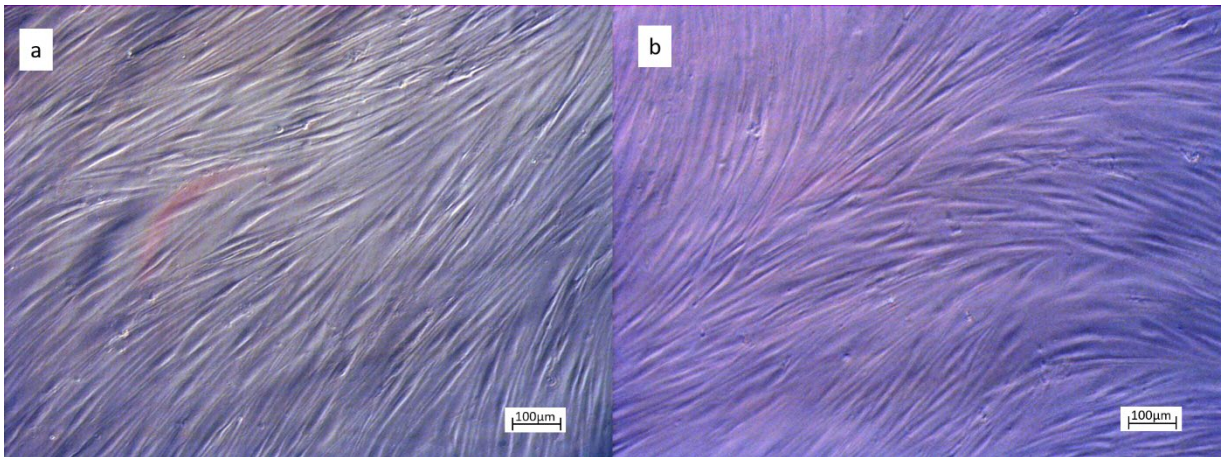


Abbildung 37: Mikroskopaufnahmen durch horizontal gedruckte und oberflächenbehandelte Probekörper mit Dicken von 1 mm (links) und 3 mm (rechts).

Abbildung 38 zeigt Mikroskopaufnahmen durch vertikal gedruckte und oberflächenbehandelte Probekörper mit Dicken von 1 mm und 3 mm.

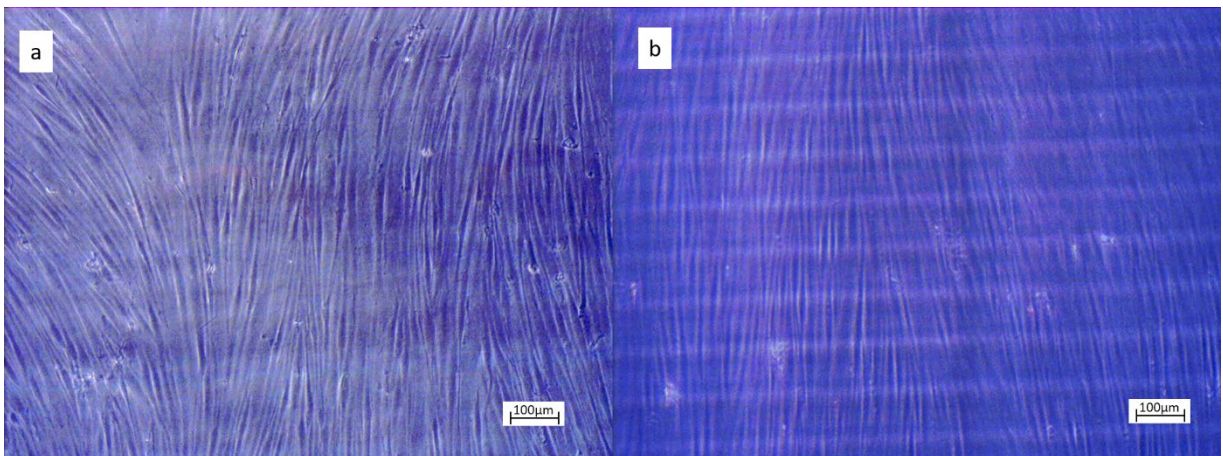


Abbildung 38: Mikroskopaufnahmen durch vertikal gedruckte und oberflächenbehandelte Probekörper mit Dicken von 1 mm (links) und 3 mm (rechts).

Wie bei den horizontal gedruckten Probekörpern sind bei den vertikal gedruckten und oberflächenbehandelten Probekörpern sowohl bei einer Dicke von 1 mm (linke Seite) als auch bei einer Dicke von 3 mm (rechte Seite) die Fibroblasten deutlich zu sehen. Weiterhin ist in den Mikroskopaufnahmen zu beobachten, dass die Struktur durch den Schichtaufbau nur bei den Probekörpern mit einer Dicke von 3 mm deutlich erkennbar ist.

Zusammenfassend lässt sich auf Grund der Experimente sagen, dass eine Oberflächenbehandlung durch Tröpfchen-Beschichtung mit dem optimierten Photopolymer eine geeignete Methode ist, um eine Transparenz zu erzeugen, die es erlaubt, Zellen mit Hilfe eines Mikroskops durch die Probekörper visuell zu untersuchen. In der Einleitung dieses

Kapitel wurde bereits eine nicht glatte Oberfläche als einer der Gründe für eine nicht transparente Oberfläche ausgemacht. Durch die Beschichtung soll eine glattere Oberfläche erreicht werden. Dieser Effekt soll im nächsten Kapitel zusätzlich durch die Beobachtung der Benetzbarkeit der Oberfläche untersucht werden, da Oberflächenstrukturen oftmals auf diese einen Einfluss haben.

7.5.2 Experiment zur Bestimmung des Kontaktwinkels

Ziel dieses Experiments war es den Einfluss der Oberflächenbehandlung durch Tröpfchen-Beschichtung auf die Benetzbarkeit der Oberfläche zu untersuchen. Grundlegend wird davon ausgegangen, dass durch die Behandlung der Oberfläche eine Glättung dieser erreicht wird und dadurch die Benetzbarkeit erhöht wird. Eine Erhöhung der Benetzbarkeit zeigt sich durch eine Reduktion des Kontaktwinkels.

Hypothese

Die Hypothese dieses Experiments bezieht sich auf den Einfluss der Oberflächenbehandlung der Probekörper auf die Benetzbarkeit der Oberfläche.

- Nullhypothese H_0 : Mit Hilfe der Oberflächenbehandlung gelingt es nicht den Kontaktwinkel auf der Oberfläche der Probekörper zu senken.
- Alternativhypothese H_1 : Mit Hilfe der Oberflächenbehandlung gelingt es den Kontaktwinkel auf der Oberfläche der Probekörper zu senken.

Herstellung der Probekörper

Für dieses Experiment wurden Probekörper auf dieselbe Weise hergestellt wie die Probekörper zur Untersuchung der Transparenz (vgl. Kapitel 7.5.1). Es wurde jedoch auf die Herstellung von Probekörper unterschiedlicher Dicke verzichtet und nur Probekörper mit einer Dicke von 1 mm verwendet.

Durchführung

Die Messungen der Kontaktwinkel auf der Oberfläche der Probekörper wurden mit dem Kontaktwinkelmessgerät OCA 20 (DataPhysics Instruments GmbH, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde mit einer Dosiereinheit ein Tropfen destilliertes Wasser mit einem Volumen von 2 μl auf die Oberfläche gegeben. Mit einer zum Kontaktwinkelmessgerät gehörenden Highspeed-Kamera wurde ein Bild des Tropfens auf der Oberfläche aufgenommen und mit Hilfe der Software SCA 20 (DataPhysics Instruments GmbH, Deutschland) der Benetzungswinkel bestimmt. Pro Probekörper wurden jeweils 15 Messungen durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Für die Auswertung wurden als statistische Größen der Minimal- und Maximalwert, Median, sowie das 25 % und 75 % Quantil ermittelt. Die Darstellung erfolgt über Boxplots mit $n=15$. Die jeweiligen Werte innerhalb einer Gruppe wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf ihre Normalverteilung überprüft. Eine Normalverteilung kann in keinem der Fälle zurückgewiesen werden. Weiterhin wurde ein Tukey-post hoc Test durchgeführt, um die Mittelwerte aller Gruppen untereinander zu vergleichen. Die Darstellung erfolgt tabellarisch mit $*=p\leq 0,05$.

Abbildung 39 zeigt die Auswertung der Kontaktwinkelmessung.

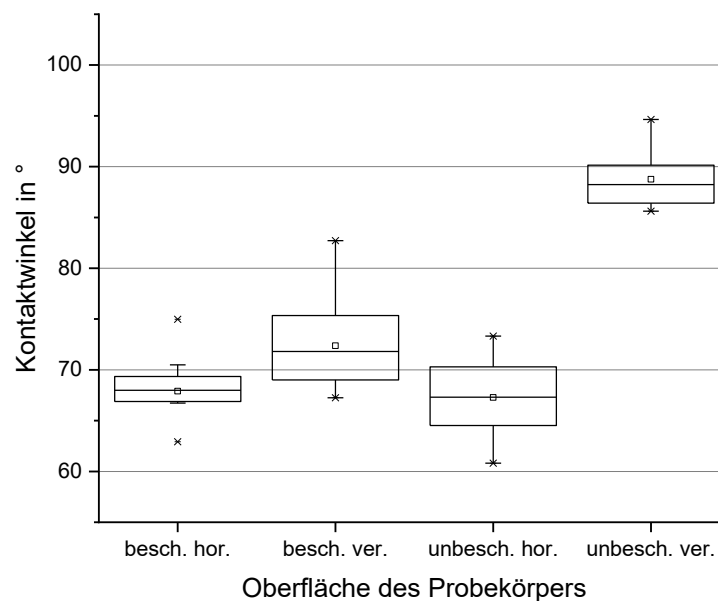


Abbildung 39: Kontaktwinkel auf unterschiedlich behandelten Oberflächen dargestellt als Boxplot und $n=15$.

Auf den horizontal gedruckten Probekörpern mit behandelter Oberfläche (besch. hor.) kann im Mittel ein Kontaktwinkel von $67,90^\circ$ gemessen werden. Vertikal gedruckte Probekörper mit einer behandelten Oberfläche (besch. ver.) weisen einen Kontaktwinkel von $72,37^\circ$ auf. Auf nicht oberflächenbehandelten horizontal gedruckten Probekörpern (unbesch. hor.) kann ein Kontaktwinkel von $67,28^\circ$ gemessen werden. Vertikal gedruckte unbehandelte Probekörper (unbesch. ver.) weisen den höchsten Kontaktwinkel mit $88,75^\circ$ auf.

Tabelle 14 zeigt die tabellarische Auswertung der Tukey-post-hoc-Analyse.

Tabelle 14: ANOVA: Turkey post-hoc Analyse der Einflüsse der Oberflächenbehandlung auf den Kontaktwinkel mit $*=p\leq 0,05$.

	Coated hor.	Coated ver.	Uncoated hor.	Uncoated ver.
Coated hor.				
Coated ver.	*			
Uncoated hor.		*		
Uncoated ver.	*	*	*	

Die Post-hoc-Analyse zeigt, dass ein signifikanter Unterschied zwischen dem Kontaktwinkel auf vertikal gedruckten, nicht behandelten Oberflächen und den Kontaktwinkeln auf behandelten Probekörpern sowie horizontal gedruckten, unbehandelten Probekörpern besteht. Weiterhin ist ein signifikanter Unterschied zwischen vertikal gedruckten, oberflächenbehandelten und horizontal gedruckten Probekörpern zu beobachten. Die Kontaktwinkel auf unbehandelten, horizontal gedruckten und behandelten horizontal gedruckten Probekörpern zeigen keine signifikanten Unterschiede.

7.6 Direkte Besiedelung additiv gefertigter Probekörper

Die chemischen sowie strukturellen Eigenschaften einer Oberfläche eines Probekörpers hat einen großen Einfluss auf das Anwachsverhalten von Zellen. Im Anschluss an die Experimente zur Oberflächenbehandlung wurden Experimente zum Anwachsverhalten von Zellen auf gedruckten Probekörpern durchgeführt.

Hypothese

Die Hypothese dieses Experiments bezieht sich auf den Einfluss der Oberflächenbehandlung auf das Anwachsverhalten von Zellen.

- Nullhypothese H_0 : Eine Behandlung der Oberfläche hat keinen positiven Einfluss auf das Anwachsverhalten von Zellen.
- Alternativhypothese H_1 : Eine Behandlung der Oberfläche hat einen positiven Einfluss auf das Anwachsverhalten von Zellen.

Herstellung der Probekörper

Für die Experimente zur Untersuchung des Anwachsverhaltens auf Probekörpern des optimierten Photopolymers wurden Nöpfchen mit einer Wachstumsfläche von $1,9 \text{ cm}^2$ gedruckt, was der Fläche von Wells einer 24er-Mikrotiterplatte entspricht. Der innere Durchmesser der Nöpfchen beträgt $16,5 \text{ mm}$, bei einer Wandstärke von 1 mm und eine Wandhöhe von 9 mm (vgl. Abbildung 40).

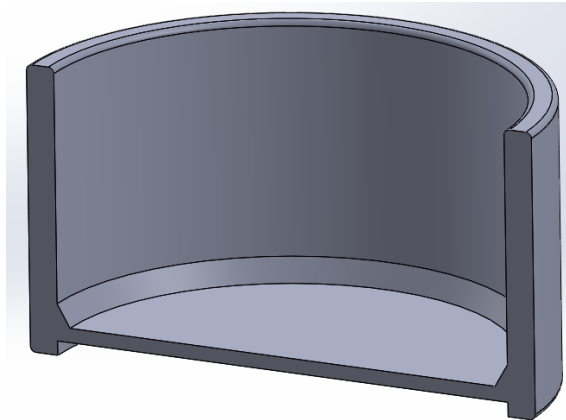


Abbildung 40: CAD-Modell der Nöpfchen für die Experimente zur Untersuchung des Anwachsverhaltens von Fibroblasten.

Für die Experimente wurden folgende Typen von Probekörpern gedruckt:

- Horizontal gedruckt, unbehandelte Oberfläche (unbesch. hor.)
- Vertikal gedruckt, unbehandelte Oberfläche (unbesch. ver.)
- Vertikal gedruckt, behandelte Oberfläche (besch. ver.)

Auf horizontal gedruckte und oberflächenbehandelte Probekörper wurde verzichtet, da davon auszugehen ist, dass die Hypothese mit den eben aufgeführten Typen von Probekörpern überprüft werden kann.

Alle Probekörper wurden in Sterilisationsbeutel verpackt und mit dem Autoklaven Hospiklav 25-Typ B (SHP Steriltechnik AG, Deutschland) bei 121 °C für 15 Minuten heißdampfsterilisiert.

Durchführung

Für die Zellversuche wurden Hs27 Zellen verwendet. Zur Untersuchung des Anwachsverhaltens der Zellen wurden unter einer Sterilwerkbank 400 µl einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von $5000 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$ in die Nöpfchen pipettiert. Als Referenz wurde eine 24er-Mikrotiterplatte verwendet. Bei dieser ist bekannt, dass Hs27 Zellen adhären und proliferieren. Alle Probekörper sowie die Referenz wurden anschließend für 7 Tage bei 37 °C und 10 % - CO₂ Gehalt inkubiert. Im Anschluss wurde ein WST-8 Test durchgeführt, um die relative Vitalität der adhären Zellen zu messen.

Ergebnisse und Diskussion

Für die Auswertung wurden als statistische Größen der Minimal- und Maximalwert, Median, sowie das 25 % und 75 % Quantil ermittelt. Die Darstellung erfolgt mittels Box-Plots. Die jeweiligen Werte innerhalb einer Gruppe wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf ihre

Normalverteilung überprüft. Eine Normalverteilung kann in keinem der Fälle zurückgewiesen werden. Weiterhin wurde ein Tukey-post hoc Test durchgeführt, um die Mittelwerte aller Gruppen untereinander zu vergleichen. Die Darstellung erfolgt tabellarisch mit $*=p\leq 0,05$. Die Ergebnisse der WST-8 Tests in den gedruckten Näpfchen wurden referenziert auf die Referenz. Abbildung 41 zeigt die Auswertung des WST-8 Tests mit $n=3$.

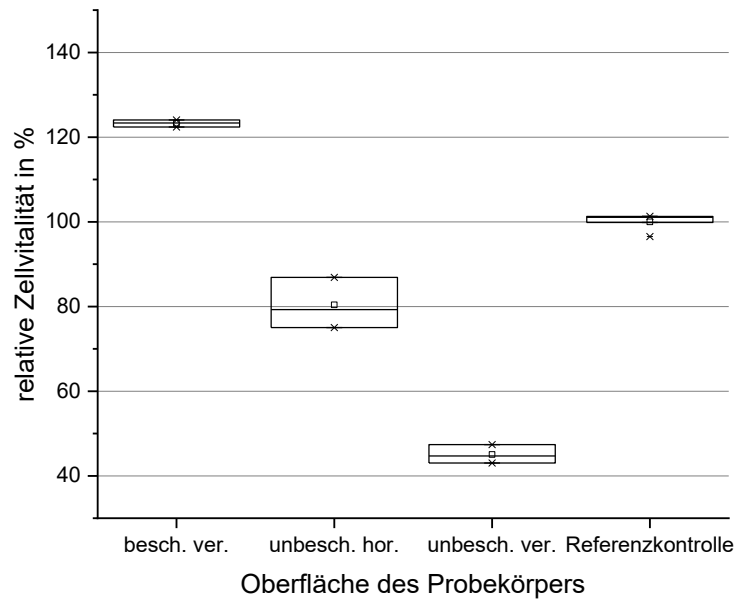


Abbildung 41: Relative Zellvitalität zur Untersuchung des Anwachsverhaltens auf gedruckten Probekörpern aus dem optimierten Photopolymer mit unterschiedlichen Oberflächen. Die Darstellung erfolgt als Boxplots mit $n=3$.

Auf vertikal gedruckten Probekörpern mit einer behandelten Oberfläche ist eine relative Zellvitalität von 123,26 % referenziert auf die Mikrotiterplatte zu beobachten. Auf nicht oberflächenbehandelten, horizontal gedruckten Probekörper beträgt die relative Zellvitalität gegenüber der Referenz 80,39 %. Die niedrigste relative Zellvitalität referenziert auf die Mikrotiterplatte kann auf nicht behandelten, vertikal gedruckten Probekörpern mit 45,04 % gemessen werden. Tabelle 15 zeigt die tabellarische Auswertung der Tukey-post-hoc-Analyse.

Tabelle 15: ANOVA: Turkey post-hoc Analyse der Einflüsse der Oberflächenbehandlung auf das Anwachsverhalten mit $*=p\leq 0,05$.

	besch. ver.	unbesch. hor.	unbesch. ver.	Mikrotiterplatte
besch. ver.				
unbesch. hor.	*			
unbesch. ver.	*	*		
Mikrotiterplatte	*	*	*	

Die Post-hoc-Analyse zeigt, dass signifikante Unterschiede der Mittelwerte zwischen allen Probekörpern sowie der Mikrotiterplatte bestehen. Das bedeutet, dass auf oberflächenbehandelten, vertikal gedruckten Probekörpern ein signifikant besseres Anwachsverhalten als auf kommerziell erwerblichen Zellkultur 24er- Mikrotiterplatten zu erreichen ist. Oberflächenunbehandelte Probekörper weisen ein signifikant schlechteres Anwachsverhalten von Fibroblasten als die Referenz auf. Vertikal gedruckte, oberflächenunbehandelte weisen das signifikant geringste Anwachsverhalten auf.

8 Anwendungsbeispiele und externe Validierung

Nachdem im vorherigen Kapitel das optimierte Photopolymer in Experimenten hinsichtlich seiner biologischen und mechanischen Eigenschaften charakterisiert wurde, soll es nun im realen Einsatz untersucht werden. Dazu werden in diesem Kapitel drei Anwendungsbeispiele aufgezeigt:

- Spezialisierter Durchflussbioreaktor
- Spezialisierter Bioreaktor zur Lagerung von Cornea-Gewebe (Hornhaut-Gewebe)
- Desktop-Bioreaktorsystem zur Kultivierung von Zellen

8.1 Spezialisierter Durchflussbioreaktor

Dieses Anwendungsbeispiel entstand im Rahmen der Semesterarbeit von Tobias Brockmeyer sowie der Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Translationszentrum Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskeletale Erkrankungen (TZKME) und soll das Potential des 3D-Drucks im Bereich des Tissue Engineerings aufzeigen. Das TZKME beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer Methoden zur Krebstherapie. Dazu werden oftmals *in-vitro* Experimente mit Bioreaktoren zur Kultivierung und Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen durchgeführt. Der Großteil der *in-vitro* Experimente basiert auf einer biologisch vaskularisierten Trägerstruktur, BioVaSc[®]. Diese wird aus einem Abschnitt eines Schweineleerdarms gewonnen, dezellularisiert und anschließend mittels Gamma-Strahlung sterilisiert. So entsteht eine dreidimensionale Trägerstruktur (Scaffold). Das Scaffold kann anschließend mit Zellen besiedelt werden und in einem Bioreaktor für *in-vitro* Experimente verwendet werden.

8.1.1 Konventionell gefertigter Bioreaktor

Ein Bioreaktor, der aktuell am TZKME eingesetzt wird, ist in Abbildung 43 zu sehen. Der Bioreaktor soll es ermöglichen, ein besiedeltes BioVaSc-Scaffold einzuspannen und von zwei Seiten mit definierten Bedingungen zu umströmen (vgl. Abbildung 42).

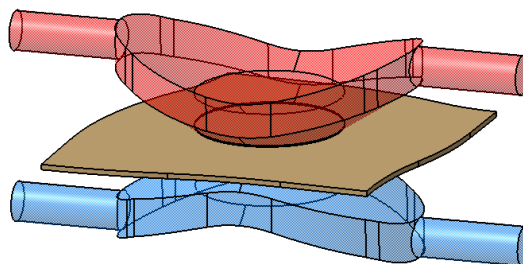


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Umströmung eines besiedelten, eingespannten Scaffolds.

Um das gewollte Strömungsbild zu realisieren, ist eine komplexe Struktur des Bioreaktors nötig. Der Bioreaktor besteht daher aus vier Einzelteilen, die mittels Fräsen aus Polysulfon hergestellt werden.

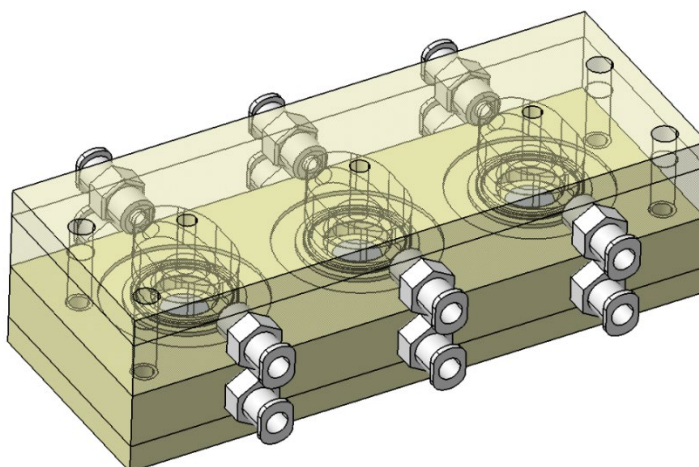


Abbildung 43: CAD-Modell eines Bioreaktors zur Realisierung einer definierten Umströmung, eines eingespannten, besiedelten BioVaSc-Scaffolds, zur Stimulierung der Zellen.

Auf Grund der aufwendigen Fertigung ist dieses Bioreaktorsystem sehr teuer und nicht wirtschaftlich in großen Stückzahlen herstellbar. Ein weiterer Nachteil des Bioreaktorsystems ist, dass der verwendete Werkstoff keine Sicht auf das durchfließende Medium erlaubt. Weiterhin müssen zum Anschluss von Medieneinlässen und -auslässen, Luer-Anschlüsse händisch in den Bioreaktor eingeschraubt werden. Dies ist ein potenzielles Risiko für das Einbringen von Kontaminationen in das Bioreaktorsystem. Weiterhin ist das Handling des Bioreaktors während des Experimentes, vor allem das Einbringen des Scaffolds, sehr aufwendig. Im Folgenden wird aufgezeigt, wie mit Hilfe der additiven Fertigung der Bioreaktor konstruktiv so optimiert wurde, um Baugruppen zu reduzieren, Funktionen zu integrieren, das Handling zu verbessern und in größerer Stückzahl produziert werden zu können. Der Großteil dieser Arbeit entstand im Rahmen der Studienarbeit von Tobias Brockmeyer.

8.1.2 Optimierung des Bioreaktors und Testung der Dichtheit

Die Optimierung des Bioreaktors geschah in mehreren Schritten:

- Baugruppenreduktion
- Integration der Luer-Anschlüsse
- Massenreduktion
- Verbesserung des Handlings

Im ersten Schritt wurde eine einzelne Zelle des bisherigen Bioreaktordesigns freigeschnitten, um die Baugruppen zu reduzieren. Aus dem vierteiligen Aufbau wurde ein zweiteiliger Aufbau erstellt (vgl. Abbildung 44). Dazu wurden der obere Teil sowie der untere Teil jeweils mit dem Mittelteil verbunden.

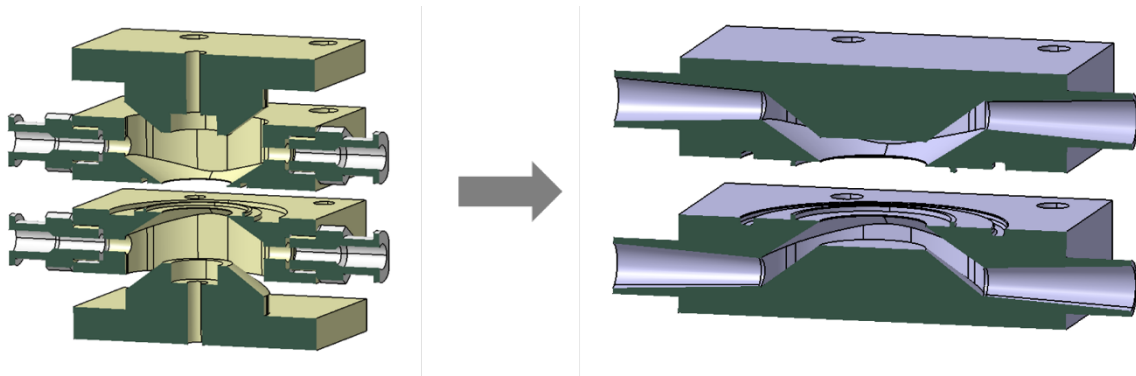


Abbildung 44: Schematisch Darstellung des Optimierungsschrittes: Baugruppenreduktion. Auf der linken Seite ist ein Rendering einer einzelnen Zelle des Bioreaktors im alten Design und auf der rechten Seite das Design nach der Baugruppenreduktion zu sehen. Die Luer-Anschlüsse sind noch nicht integriert.

Anschließend wurden die Luer-Anschlüsse in die Baugruppe integriert, sodass ein nachträgliches Aufbohren, Gewindeschneiden und Einschrauben nicht mehr notwendig ist. Der nächste Schritt beinhaltete eine Reduktion der Masse. Dazu wurden die Wandstärken um die innere Strömungskontur (vgl. Abbildung 42) auf ein Minimum reduziert. Abbildung 45 zeigt die eben beschriebenen Schritte.

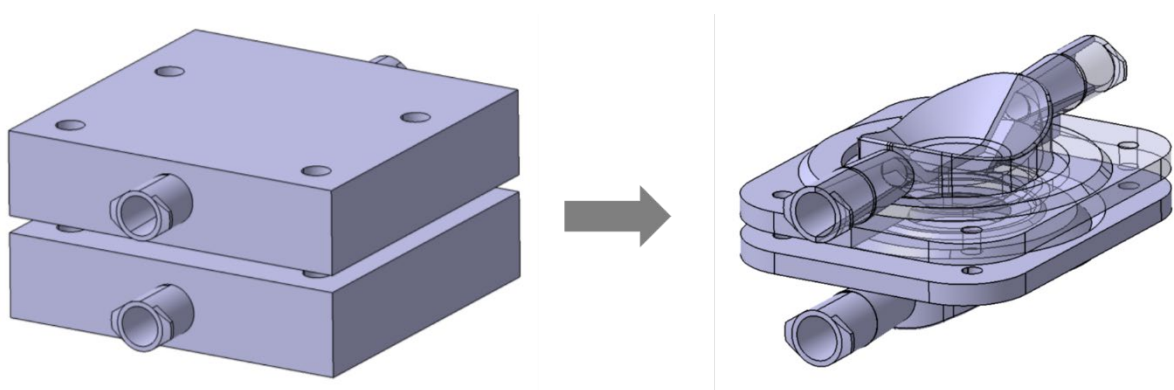


Abbildung 45: Schematische Darstellung der Integration der Luer-Anschlüsse und einer anschließenden Massenreduktion der Baugruppe.

Ein entscheidendes Kriterium zum Einsatz des Designs ist dessen Dichtheit. Um diese zu überprüfen, wurde ein Versuch zur Testung der Dichtheit durchgeführt (vgl. Abbildung 46).

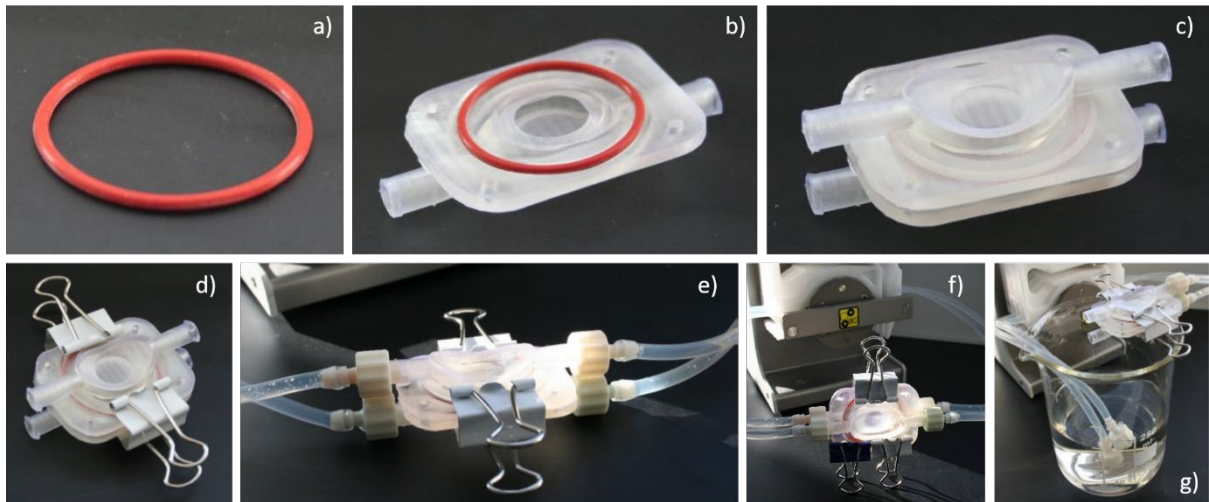


Abbildung 46: Zusammenbau des gedruckten Bioreaktors zur Überprüfung der Dichtheit.

In eine Hälfte des gedruckten Bioreaktors wurde ein Dichtring eingesetzt und mit der zweiten Hälfte geschlossen (vgl. Bilder a-c in Abbildung 46). Im Anschluss wurde der Zusammenbau provisorisch mit Klammern geschlossen (vgl. Bild d in Abbildung 46). Der geschlossene Bioreaktor wurde mit den Luer-Anschlüssen an eine Rollerpumpe angeschlossen, um Wasser durch den Reaktor laufen zu lassen (vgl. Bilder e-f in Abbildung 46). Im Rahmen des Versuches konnte keine Undichtigkeit des Zusammenbaues beobachtet werden.

8.1.3 Finales Design des Bioreaktors

Nachdem die Dichtheit des Bioreaktors nachgewiesen wurde, wurde in einem abschließenden Optimierungsschritt das Handling des Bioreaktors verbessert. Abbildung 47 zeigt die finale Version des gedruckten Bioreaktors.

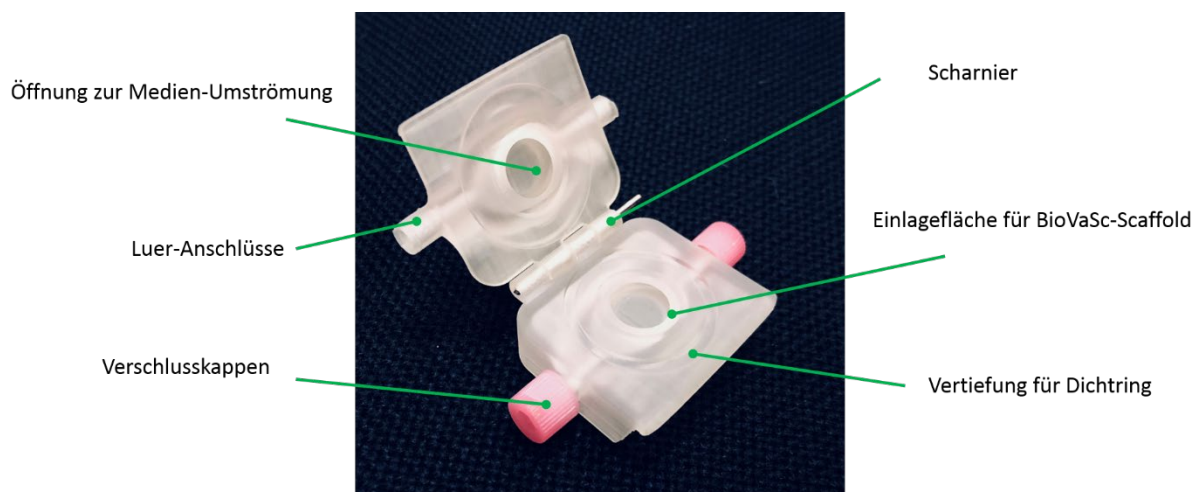


Abbildung 47: Finales Design des optimierten 3D-gedruckten Bioreaktors.

Die beiden Hälften wurden so modifiziert, damit sie sich mit einem Scharnier verbinden lassen. So kann in die Mitte des Bioreaktors das Scaffold eingelegt werden und die beiden Hälften in einem Arbeitsschritt zusammengeklappt werden. Die gegenüberliegenden Seiten wurden leicht angeschrägt, damit ein Schieber (dieser kann ebenfalls 3D-gedruckt werden) zum Verschluss des Reaktors eingesetzt werden kann.

Biologische Untersuchungen mit besiedelten Scaffolds konnten leider nicht im Rahmen der Arbeit durchgeführt werden. Dies soll in Folgearbeiten im Anschluss an diese Arbeit getan werden.

8.2 Spezialisierter Bioreaktor zur optimierten Lagerung von Cornea-Gewebe

Dieses Anwendungsbeispiel entstand erneut in der Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Translationszentrum Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskelettale Erkrankungen (TZKME) sowie im Rahmen der Masterarbeit von Richard Schmid. Ziel war es einen spezialisierten Bioreaktor für die dynamische Lagerung von Cornea-Gewebe mittels 3D-Drucks herzustellen. Der Bioreaktor wurde aus dem optimierten Photopolymer gedruckt und anschließend im realen Einsatz validiert.

Die Cornea (Hornhaut) ist der vordere Abschluss der äußeren Augenhaut und sehr wichtig für die Lichtbrechung des Auges. Verletzungen der Hornhaut können zu Opazität oder Blindheit führen (Resnikoff et al. 2004, Schmid et al. 2018). Eine Therapie sieht in der Regel eine Transplantation eines Spendergewebes vor. Die Cornea ist das meisttransplantierte Organ weltweit, auf Grund des hohen Bedarfs kommt es aber dennoch zu langen Wartelisten (Schmid et al. 2018).

Die menschliche Hornhaut besteht insgesamt aus sechs Schichten:

1. Epithelschicht
2. Bowman-Membran
3. Stroma
4. Dua-Schicht
5. Descemet-Membran
6. Endothelschicht

Eine mikroskopische Überprüfung des Transplantates ist eine der essenziellen Untersuchungen ob das Cornea-Spendergewebe noch zu transplantieren ist, oder verworfen werden muss (Jirsova et al. 2017). Abbildung 48 zeigt eine intakte Epithelschicht sowie eine intakte Endothelschicht eines gesunden Cornea-Gewebes.

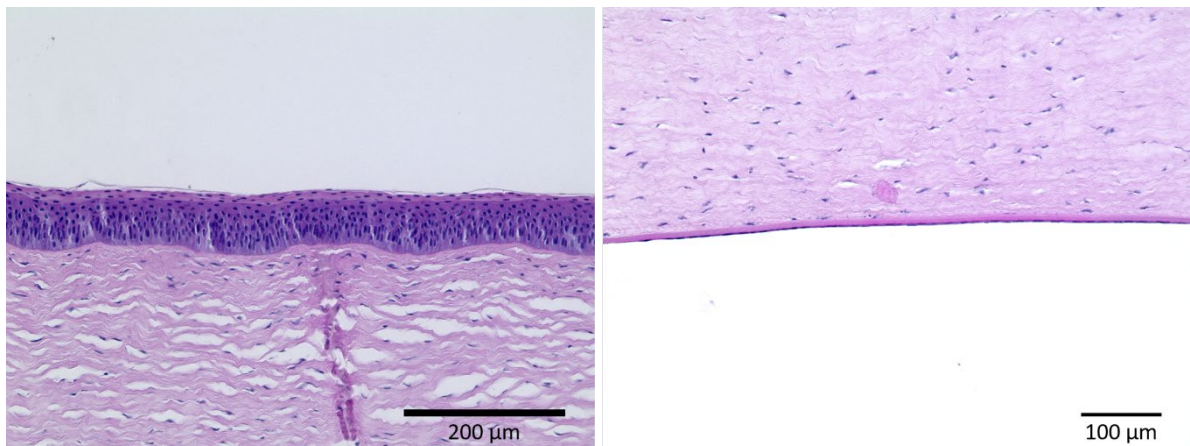


Abbildung 48: Epithelschicht (links) und Endothelschicht (rechts) eines intakten Cornea-Gewebes.

Ein weiteres Kriterium zur Freigabe eines Spendergewebes nach der Lagerung ist die sogenannte „Endothelial Cell Density“, kurz die ECD. Diese entspricht der Anzahl von Endothelzellen pro mm^2 . In der Regel wird ein ECD von mehr als 2000 Zellen/ mm^2 verlangt, damit das Spendergewebe freigegeben wird (Jirsova et al. 2017).

Zur Lagerung des Cornea-Gewebes bis zum Zeitpunkt der Transplantation stehen unterschiedliche, in der Regel statische Methoden zur Verfügung. In den USA ist der Standard eine hypothermische Lagerung bei $2^\circ - 8^\circ \text{C}$, die eine Lagerung von bis zu 14 Tagen erlaubt (Lindstrom et al. 1992, Schmid et al. 2018). In Europa erfolgt die Lagerung in Augenbanken bei $28^\circ - 37^\circ \text{C}$ in Zellkulturmedien, was eine längere Erhaltung des Gewebes bewirkt. Eines der Hauptprobleme bei der Lagerung des Cornea-Gewebes ist die Erhaltung der Epithelschicht. Auf Grund der hohen Qualitätsstandards muss ein Großteil des Spendergewebes verworfen werden (Röck et al. 2016, Schmid et al. 2018).

8.2.1 Design des 3D-gedruckten Bioreaktors zur dynamischen Lagerung von Cornea-Gewebe

Im Rahmen der Masterarbeit von Richard Schmid wurde ein additiv fertiger Bioreaktor zur dynamischen Kultivierung von Cornea-Gewebe entwickelt. Abbildung 49 zeigt den Zusammenbau sowie die beiden Hälften des Reaktors. Im Folgenden wird der Aufbau im Detail erklärt.

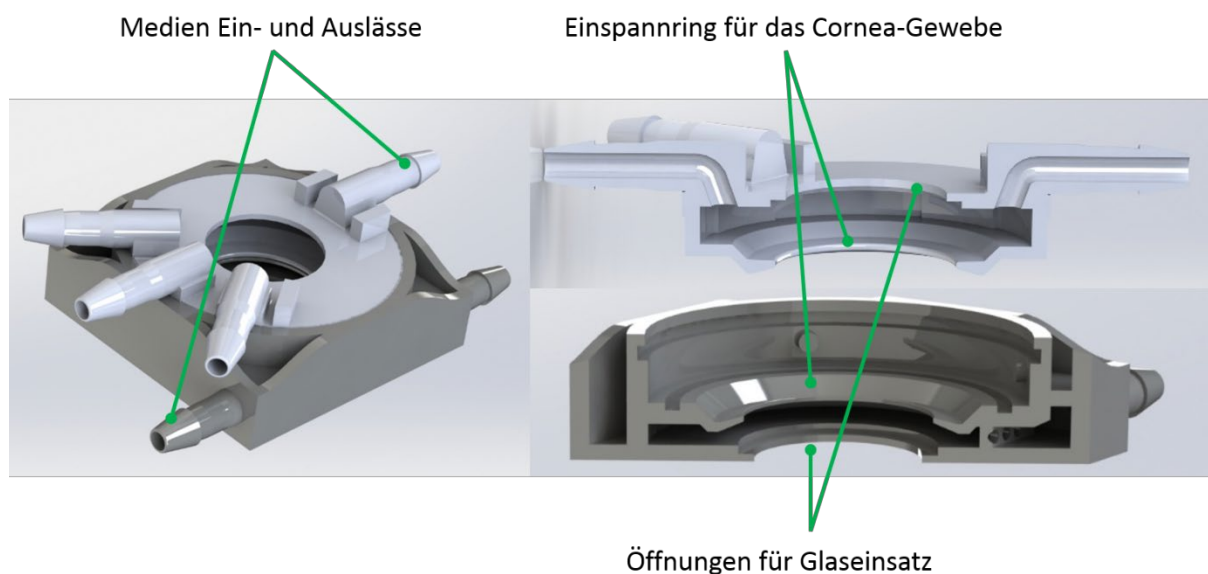


Abbildung 49: Additiv fertiger Bioreaktor zur dynamischen Lagerung von Cornea-Gewebe. Modifiziert nach (Schmid et al. 2018).

Der Bioreaktor besteht aus zwei Einzelteilen, die ineinander steckbar sind und durch ein Verdrehen zueinander geschlossen werden können. In der Mitte beider Hälften befindet sich jeweils ein Einspannring zur Fixierung des Cornea-Gewebes. Die Einspannringe sind jeweils 15° geneigt, um das Cornea-Gewebe so zu arretieren, dass es seiner natürlichen Form im menschlichen Auge gleicht. Im zusammengebauten Zustand beträgt der Abstand zwischen beiden Ringen $200\ \mu\text{m}$. Durch das Einspannen des Cornea-Gewebes entstehen zwei voneinander abgetrennte Fluid-Bereiche. Weiterhin ist in beiden Hälften eine Öffnung mit einer Vertiefung vorgesehen, um eine Glasplatte für eine optische Analyse des Gewebes einzubringen. Zum Zeitpunkt der Konstruktion des Reaktors waren die Untersuchungen zur direkten Erzeugung von transparenten Bereichen mittels 3D-Druck (beschrieben in Kapitel 7.5.1) noch nicht abgeschlossen. Deshalb wurde für diesen Reaktor die Transparenz durch das Einbringen eines Glaseinsatzes in einem nachfolgenden Schritt realisiert.

Das Cornea-Gewebe wird so eingespannt, dass der untere Bereich des Bioreaktors den Fluidraum für den Endothelbereich des Cornea-Gewebes bildet. Der normale Augeninnendruck liegt bei gesunden Personen in der Regel zwischen 10-21 mmHg mit einem Mittelwert von 15,5 mmHg (Lamparter et al. 2009). Der simulierte Druck auf das Cornea-Gewebe im gedruckten Bioreaktor soll durch einen eingebrachten Fluiddruck im unteren Fluidbereich nachgestellt werden. Die Perfusion erfolgt nicht direkt, um eine möglichst gleichmäßige Druckverteilung zu erhalten. Dazu wurden kleine Kanäle konstruiert, die gemeinsam wie ein Richtblech wirken, um einen gleichmäßigen Staudruck aufzubauen (vgl. Abbildung 50).

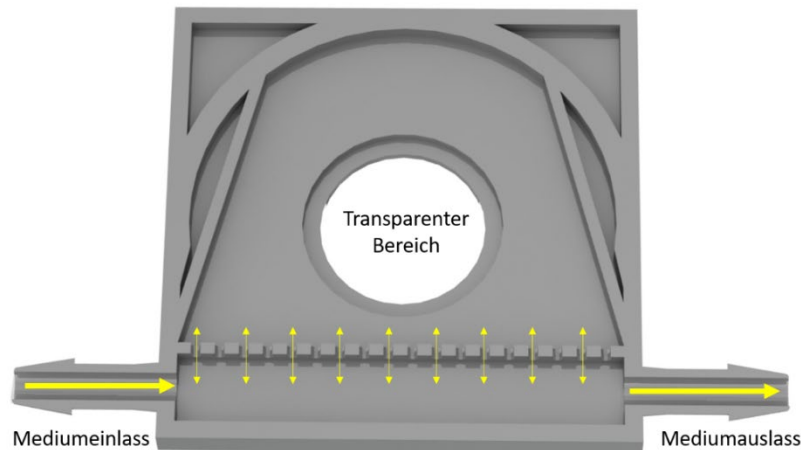


Abbildung 50: Unterer Teil des Bioreaktors zur Optimierten Lagerung von Cornea-Gewebe. Der untere Teil begrenzt den Fluidbereich, der mit der Endothel-Seite des Gewebes in Kontakt kommt.

Weiterhin beinhaltet der untere Bereich des Bioreaktors einen Mediumeinlass, sowie einen Mediumauslass. Der transparente Bereich in der Abbildung ist mit einem Glaseinsatz verschlossen. Nach oben wird der untere Teil des Bioreaktors durch das Cornea-Gewebe (Endothel-Seite) begrenzt, sodass sich ein Druck ausbilden kann. Der Druck kann durch die Einlassgeschwindigkeit reguliert werden.

Das Oberteil des Reaktors enthält vier Anschlüsse. Zwei davon sind für den Mediumaustausch und zwei für den Anschluss von Luftfiltern, um einen Gasaustausch mit den Umgebungsbedingungen im Inkubator zu realisieren (vgl. Abbildung 51 linkes Bild).

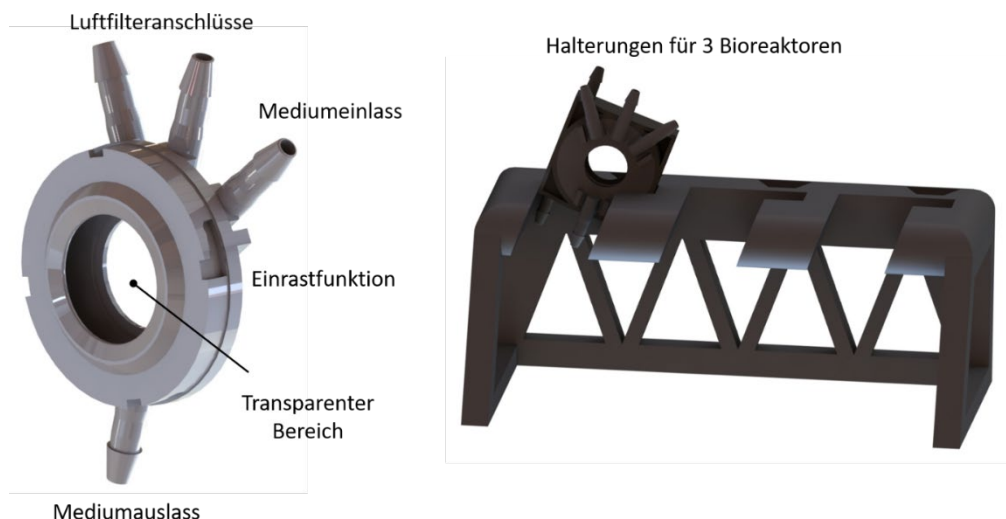


Abbildung 51: Obere Seite des Bioreaktors mit zwei Mediumanschlüssen sowie zwei Anschlüssen für Luftfilter (links). Halterung für bis zu drei Bioreaktoren (rechts).

Der obere Bereich des Bioreaktors weist ebenfalls einen transparenten Bereich auf, der mit einem Glaseinsatz verschlossen ist. Er bildet den Fluidraum zur Epithelschicht des Cornea-Gewebes. Durch den Mediumeinlass kann solange Medium in den Bereich gefördert werden, bis die Epithelseite des Cornea-Gewebes vollständig bedeckt ist. Durch die Luftöffnungen entsteht kein Druck auf dieser Seite. Durch ein Abpumpen durch den Mediumauslass kann die Epithelseite des Cornea-Gewebe einer Luftumgebung ausgesetzt werden. Dies soll die natürliche Umgebung der Cornea im geöffneten menschlichen Auge simulieren. Über Einrastelemente lassen sich der untere Bereich und der obere Bereich des Bioreaktors verbinden und mit Hilfe von O-Ringen fluiddicht gegeneinander abtrennen.

Weiterhin zeigt Abbildung 51 einen Ständer für die Befestigung von drei Bioreaktoren. Die beiden Luftfilteranschlüsse sind dabei nach oben gerichtet, sodass diese stets höher liegen als das Medium der Epithel-Seite des Cornea-Gewebes. Der Ständer zur Befestigung der Reaktoren, kann ebenfalls 3D-gedruckt werden.

8.2.2 Experiment zum Vergleich der statischen Lagerung gegenüber der Lagerung im dynamischen 3D-gedruckten Bioreaktor

In Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Translationszentrum Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskelettale Erkrankungen (TZKME) wurde der aus dem optimierten Photopolymer gedruckte Bioreaktor für die Lagerung von Cornea-Gewebe eingesetzt. Ziel des Experiments war es den Einfluss der dynamischen Lagerung im 3D-gedruckten Bioreaktor auf die Qualität eines Cornea-Transplantats zu bestimmen, verglichen mit der statischen Lagerung in einer Zell-Krone.

Herstellung des Bioreaktors und der Zellkronen

Der in diesem Kapitel vorgestellte Bioreaktor wurde mit dem 3D-Drucker ASIGA UV MAX (Asiga, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 100 µm gedruckt. Die gedruckten Probekörper wurden händisch mit 99,8 %iger Ethanollösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) gereinigt, um anhaftendes Restphotopolymer zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Reinigung in dem Ultraschallbad Sonorex Super RK 255 H (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) mit ebenfalls 99,8 % iger Ethanollösung für 10 Minuten. Nach der Reinigung wurden die Probekörper in der UV-Kammer CD-1 (pro3dure medical GmbH, Deutschland) für 4 Minuten unter Stickstoffatmosphäre ausgehärtet.

Als Referenz diente in diesem Experiment die Lagerung in Zellkronen. Die Zellkronen wurden vom TZKME zur Verfügung gestellt und bestanden aus zwei Edelstahlringen, zwischen welche das Cornea-Gewebe eingespannt werden kann. Somit wird es ermöglicht, zwei abgetrennte Fluidbereiche für die Endothelseite sowie die Epithelseite des Gewebes zu schaffen (Schmid et al. 2018).

Durchführung

Als biologisches Ausgangsmaterial diente Cornea-Gewebe von Schweinen. Dazu wurden Schweine-Augen am Tag des Experiments von einer lokalen Metzgerei (Metzgerei Hollerbach, Deutschland) in der Nähe des TZKME gekauft. Nach dem Schlachten wurden die Schweineaugen direkt in DMEM (Invitrogen, Deutschland), zusätzlichen 10 % fetalem Kalbsserum (Lonza, Deutschland) sowie 1 % Penicillin / Streptomycin (100x konzentriert, PAA Laboratories GmbH, Deutschland) gelagert. Kurz vor dem Experiment wurde das Cornea-Gewebe zusammen mit einem ca. 3 mm dickem skleralen Ring explantiert (vgl. Abbildung 52), 8-mal mit PBS (Invitrogen, Deutschland) gewaschen und im Anschluss direkt für die Lagerung in der Zellkrone oder dem Bioreaktor verwendet.

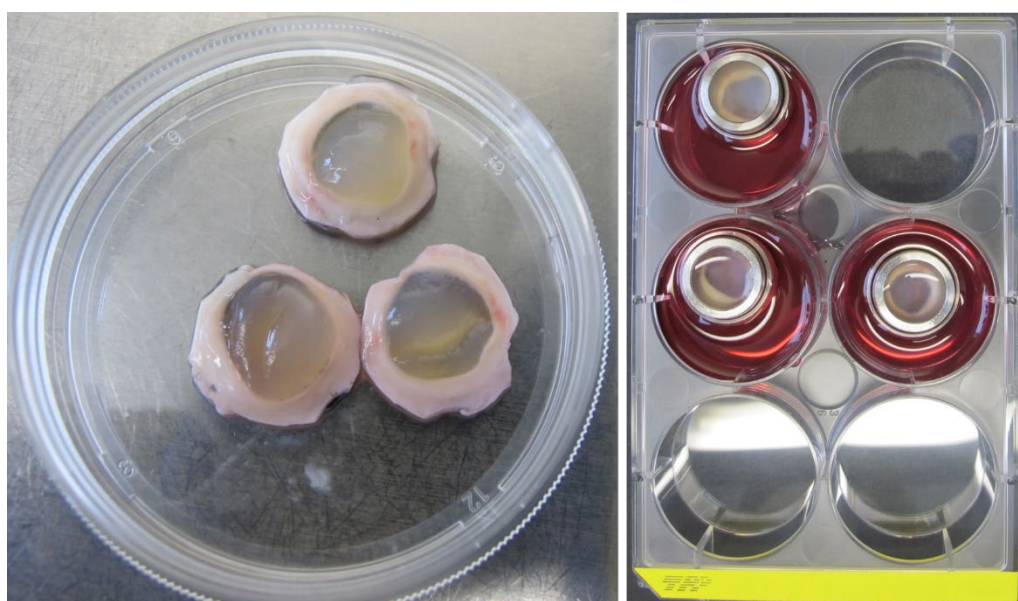


Abbildung 52: Explantierte Cornea mit skleralem Ring eines Schweineauges (links) und in einer Zellkrone eingespanntes Cornea-Gewebe (rechts).

Für die Lagerung in der Zellkrone wurde das Cornea-Gewebe eingespannt und in einer Tauchkultur gelagert. Für die Tauchkultur wurden unterschiedliche Medienkombinationen für die Epithel-Seite des Gewebes und die Endothel-Seite verwendet. Als Referenz wurde sowohl für die Epithel-Seite des Gewebes als auch die Endothel-Seite jeweils Biochrom M1 (Merck Biochrom GmbH, Deutschland) verwendet, wie es auch derzeit in einer Augenbank der Standard für die statische Lagerung ist. In einem weiteren Versuch wurde für die Epithel-Seite des Gewebes EpiLife® Basal Medium (Cascade Biologics, USA) und VasuLife® (LifeLine Cell Technology, USA) für die Endothel-Seite verwendet. Zusätzlich wurde in diesem Versuch dem Medium für beide Seiten 1 % Gentamicin (Genaxxon bioscience GmbH, Deutschland), 1 % Penicillin /Streptomycin (100x konzentriert, PAA Laboratories GmbH, Deutschland) und 1 % Amphotericin B (Thermo Fisher Scientific, USA) zugegeben.

Die Lagerung erfolgte für 7 Tage in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte. Schmid et al. untersuchten im Rahmen einer Veröffentlichung zusätzlich unterschiedliche Kulturmedien für die statische Lagerung (Schmid et al. 2018). Wie aus der Studie hervorgeht, konnten keine signifikanten Verbesserungen durch die Verwendung anderer Medien beobachtet werden, weshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter darauf eingegangen wird.

Für die Lagerung im Bioreaktor wurde das Cornea-Gewebe zwischen die beiden Ringe in die Mitte des gedruckten Reaktors eingespannt. Der Fluidraum auf Seite des Endothels des Cornea-Gewebes wurde konstant mit VascuLife® bei einem Volumenstrom von 9 ml/min durchströmt. Auf der Epithel-Seite wurde EpiLife® Basal Medium bei einem Volumenstrom von 37,5 ml/min für 25 Sekunden eingepumpt und im Anschluss wieder abgepumpt. So wurde ein konstanter Wechsel zwischen Mediumumgebung und Gasumgebung erzeugt, um die natürliche Umgebung der Cornea zu simulieren, bei der die Epithelseite stetig durch den Lidschlag mit Flüssigkeit benetzt wird. Weiterhin wurde bei der Lagerung des Reaktors darauf geachtet, dass die beiden Luftfilteranschlüsse der Oberseite des Reaktors die höchsten Punkte waren, sodass kein Medium hier austreten konnte. Abbildung 53 zeigt die Lagerung des Cornea-Gewebes im 3D-gedruckten Bioreaktor. Die Lagerung erfolgte ebenfalls in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte.

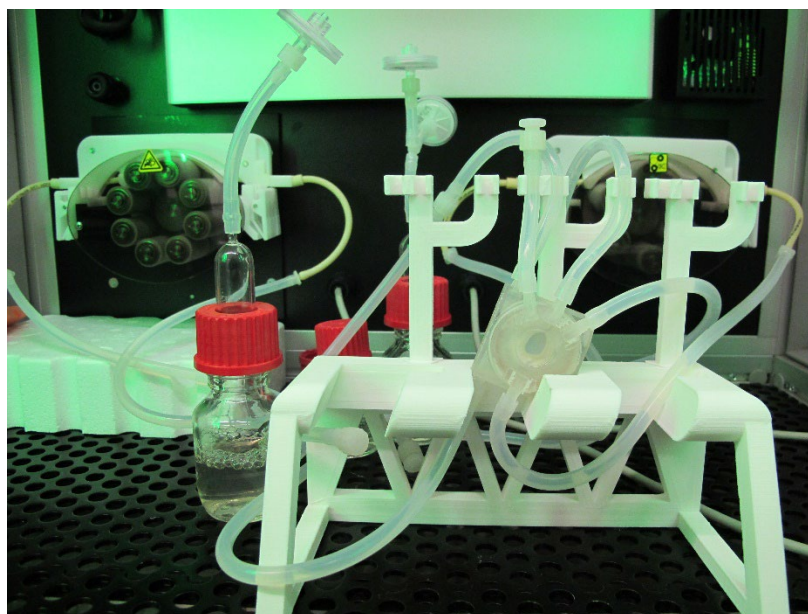


Abbildung 53: 3D-gedruckter Bioreaktor im Inkubator zur dynamischen Lagerung von Cornea-Gewebe.

Zur Charakterisierung des Cornea-Gewebes nach der Lagerung wurden histologische Untersuchungen in Form von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (H&E-Färbung) durchgeführt. Nach der Entnahme des Cornea-Gewebes aus den Zellkronen sowie dem Bioreaktor fand eine Fixierung in 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung (AppliChem GmbH, Deutschland) für 10 Minuten bei Raumtemperatur statt. Die fixierten Proben wurden dreimal für jeweils

5 Minuten mit PBS (Invitrogen, Deutschland) gewaschen und anschließend in PBS bei 4 °C gelagert. Um die H&E-Färbung durchzuführen, wurde eine Paraffineinbettung vorgenommen. Dazu wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (50 %, 70 %, 80 % und 96 %) entwässert und anschließend in Paraffin (Carl Roth GmbH, Deutschland) eingebettet. Nach dem Aushärten wurden Dünnschnitte mit einer Dicke von 4,5 µm erzeugt. Vor der H&E-Färbung wurde das Paraffin bei 60 °C ausgeschmolzen. Zur Färbung wurde das Gewebe für 6 Minuten in Haematoxylin (Carl Roth GmbH, Deutschland) gegeben, mit VE-Wasser gespült und für weitere 5 Minuten in Leitungswasser gelagert. Anschließend erfolgte eine Färbung in Eosin (Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland) für weitere 6 Minuten und ein abschließendes Spülen mit VE-Wasser. Um die Proben zu stabilisieren wurden sie erneut entwässert, mit dem Eindeck-Medium Entellan (Merck GmbH, Deutschland) bedeckt und mit Deckgläsern abgeschlossen.

Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 54 zeigt die Auswertung der H&E-gefärbten Dünnschnitte.

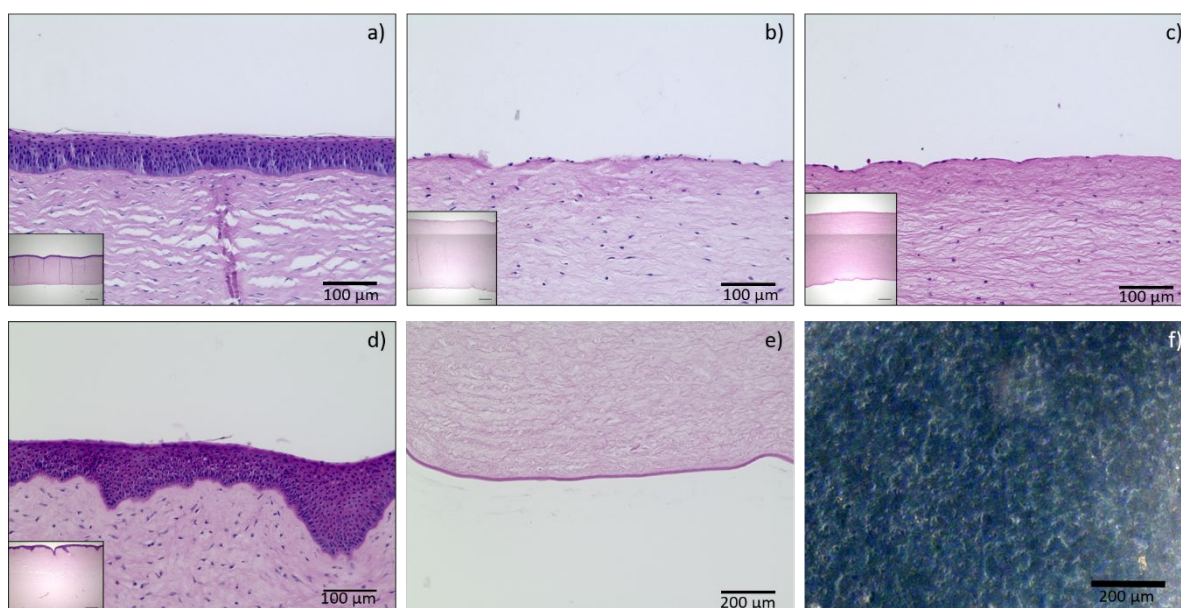


Abbildung 54: Dünnschnitte H&E-gefärbter Cornea nach unterschiedlichen Lagerbedingungen (Bilder a-e). a) frisches Cornea-Gewebe b) Lagerung in einer Zellkrone mit Biochrom als Medium c) Lagerung in einer Zellkrone mit EpiLife® und VascuLife® als Medium d) Lagerung im 3D-gedruckten Bioreaktor mit EpiLife® und VascuLife® als Medium e) Endothelseite nach Lagerung im 3D-gedruckten Bioreaktor mit EpiLife® und VascuLife® als Medium. Abbildung f) zeigt ein Lichtmikroskop-Bild der Endothelschicht während der Lagerung im 3D-gedruckten Bioreaktor

Bild a) der Abbildung 54 zeigt frisches Cornea-Gewebe. Die intakte Epithelschicht auf der Oberseite ist deutlich zu sehen (dunkelvioletter Bereich). Auf den Bildern b) und c) sind

Dünnschnitte von Gewebe nach der statischen Lagerung in einer Zellkrone in unterschiedlichen Medien zu sehen. Sowohl nach der Lagerung in Biochrom-Medium als auch nach der Lagerung in EpiLife® und VascuLife® ist deutlich zu sehen, dass ein Verlust der Epithelschicht aufgetreten ist. Bild d) zeigt den Dünnschnitt des Gewebes nach der dynamischen Lagerung im 3D-gedruckten Bioreaktor. Der Erhalt der Epithelschicht ist deutlich zu sehen. Bild e) zeigt die Endothelschicht der Cornea nach der dynamischen Lagerung im 3D-gedruckten Bioreaktor. Die Charakterisierung des Gewebes zeigt, dass die dynamische Lagerung im optimierten, 3D-gedruckten Bioreaktor einen großen Einfluss auf den Erhalt des Gewebes hat. Im Gegensatz zur statischen Lagerung in der Zellkrone konnte die Epithelschicht im 3D-gedruckten Bioreaktor erhalten bleiben.

Weiterhin kann auf Bild f) der Abbildung 54 gesehen werden, dass es möglich war, die Endothelschicht während der Lagerung im 3D-gedruckten Bioreaktor durch den Glaseinsatz zu fokussieren und mit einem Lichtmikroskop Aufnahmen dieser zu erstellen. Eine nicht-invasive Inline-Bewertung des Gewebes ist somit möglich. Wie bereits erwähnt, wurden zum Zeitpunkt des Designs des 3D-gedruckten Bioreaktors noch keine Experimente hinsichtlich des Erhalts transparenter Bereiche durch gezielte Nachbearbeitung gedruckter Proben durchgeführt.

Wie in diesem Kapitel gezeigt wurde, eignet sich das optimierte Photopolymer für den realen Einsatz. Mit Hilfe der additiven Fertigung konnte ein optimierter Bioreaktor entwickelt werden, der eine dynamische Lagerung von Cornea-Gewebe ermöglicht. Dadurch konnte nach 7 Tagen Lagerung eine deutliche Verbesserung gegenüber der Lagerung in einer Zellkrone beobachtet werden.

8.3 Desktop-Bioreaktorsystem

Das dritte Anwendungsbeispiel, welches im Rahmen dieser Arbeit beschrieben wird, ist ein selbst designer Bioreaktor in Kombination mit einer „Docking-Station“, die es erlaubt, biologische Versuche außerhalb eines Biolabors durchzuführen. Als Zielapplikation wurde die Durchführung von Zytotoxizitätstest ohne Vorhandensein eines Biolabors angestrebt. In diese Entwicklung sind Teile der Masterarbeit von Mario Reidl, der Semesterarbeit von Andreas Bachmann sowie der wissenschaftlichen Hilfstätigkeit von Christoph Rehekampff eingeflossen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass das optimierte Photopolymer für den Langzeiteinsatz mit biologischem Gewebe geeignet ist, dass es möglich ist transparente Bereiche mit einer Nachbearbeitung zu schaffen sowie ein Zellanwachsen, auf der Oberfläche nachbearbeiteter gedruckter Bereiche, realisierbar ist. Zusammen mit der Designfreiheit, welche die additive Fertigung mit sich bringt, sollte ein innovatives Bioreaktorsystem entwickelt werden, mit dem es möglich ist, Zytotoxizitätstest ohne Biolabor durchzuführen.

8.3.1 Konzept und Anforderungen

Nach aktuellem Stand der Technik dauert ein Zytotoxizitätstest, mit einer Elutionsdauer von 3 Tagen, in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 10993-5 ca. 6 Tage und kostet zwischen 250 Euro und 1.000 Euro (durchgeführt in einem zertifizierten Labor). Abbildung 55 zeigt schematisch den Ablauf eines solchen Tests, wie er auch im Rahmen dieser Arbeit selbständig durchgeführt wurde. Mit Hilfe der additiven Fertigung und des optimierten Photopolymers soll ein neues Bioreaktorsystem entwickelt werden, welches es erlaubt die Dauer auf 4 Tage zu reduzieren und ohne Vorhandensein eines Biolabors durchzuführen.

Tag	Stand der Technik Zytotoxizitätstest	Zytotoxizitätstest mit neuem Bioreaktor
1	<ul style="list-style-type: none"> 9:00 Uhr • Probekörper Vorbereitung • Beginn der Extraktion (Elution) 	<ul style="list-style-type: none"> 9:00 Uhr • Probekörper Vorbereitung • Besiedelung des Bioreaktors
2		<ul style="list-style-type: none"> 9:00 Uhr • Einbringen von Probekörper • Beginn der Extraktion (Elution)
3	<ul style="list-style-type: none"> • Besiedelung einer 96-Wellplate 	
4	<ul style="list-style-type: none"> 9:00 Uhr • Giften: Zugabe der Eluate 	<ul style="list-style-type: none"> 9:00 Uhr
5		<ul style="list-style-type: none"> 9:00 Uhr WST-Test (1h)
6		
7	<ul style="list-style-type: none"> 9:00 Uhr WST-Test (1h) 	

Abbildung 55: Ablauf eines Zytotoxizitätstests in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 10993 nach aktuellem Stand der Technik sowie nach dem neuem Konzept mit Hilfe eines im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Bioreaktorsystems.

Die grundlegende Idee besteht darin, in einem geeignetem Bioreaktor die Elution und die Proliferation der Zellen zu parallelisieren. Lösen sich toxische Bestandteile aus zu testenden Prüfkörpern, wird es zu keiner Proliferation der Zellen kommen. Im geplanten Konzept ist es angedacht, in einem Bioreaktor Zellen an dessen Boden adhären zu lassen. Der Boden soll mikroskopierbar sein, damit eine optische Analyse der Zellen durchgeführt werden kann. Im zweiten Schritt soll ein Prüfkörper eingelegt werden können, sodass er vollständig mit Extraktionsmedium umgeben ist, und das Oberflächen-Volumen-Verhältnis aus der Norm erfüllt ist. Weiterhin muss darauf geachtet werden, dass der Prüfkörper nicht auf den Zellen aufliegt und diese mechanisch belastet.

Um den Zellen die gleichen Umgebungsbedingungen (Temperatur, CO₂-Gehalt, etc.) wie in einem Inkubator in einem biologischen Labor zu bieten, soll der Bioreaktor an eine „Docking-Station“ angeschlossen werden, welche für die Erzeugung und Aufrechterhaltung der

Umgebungsbedingungen verantwortlich ist. Zusammengefasst wurden somit folgende Punkte als spezifische Zielsetzungen definiert:

- Bioreaktor mit mikroskopierbarem Boden
- Temperierfunktion zur Aufrechterhaltung einer definierten Temperatur im Bioreaktor
- Begasungsfunktion zur Zugabe von CO₂, um einen definierten pH-Wert im Medium aufrechtzuerhalten
- Möglichkeit zum Einbringen eines Prüfkörpers, der auf seine zytotoxischen Eigenschaften untersucht werden soll

Ziel im Rahmen dieser Arbeit war es einen Proof of Concept zu leisten. Die dafür durchgeführten jeweiligen Entwicklungsschritte sowie zugehörigen Experimente werden im Folgendem detailliert beschrieben.

8.3.2 Grundaufbau des Bioreaktors, Temperierungskonzept und CO₂-Versorgung

Als Grundaufbau wurde sich für einen Bioreaktor mit einer runden Anwachfläche entschieden. Der Innendurchmesser des Bioreaktors wurde für den ersten Prototyp auf 19 mm, bei einer Wandstärke von 1 mm und die Höhe auf 30 mm festgelegt. Eine detaillierte Berechnung zur Auslegung des Bioreaktors wird in Kombination mit der Definition der Probekörper sowie der Auslegung der Probekörperhalterung (vgl. Kapitel 8.3.4) beschrieben. Zunächst wurden einige Vorversuche bezüglich der Temperierung des Bioreaktors durchgeführt. Als erstes Temperierungskonzept wurde sich für eine Ringheizung mit temperiertem Wasser entschieden (vgl. Abbildung 56).



Abbildung 56: Rendering des ersten Designmusters des Bioreaktors inklusive Temperier-Ring (links). 3D-gedruckter Bioreaktor mit Dichtungsring, Deckel und Zellkulturmedium im Inneren. Der Temperiererring ist mit einer bläulich-gefärbten Flüssigkeit durchströmt.

Zur Validierung des Konzeptes wurden in den Bioreaktor 4 ml Leitungswasser bei Raumtemperatur gegeben. Mit Hilfe einer Rollerpumpe wurde die Ring-Heizung mit 37 °C warmen Wasser durchströmt. Mit Hilfe eines digitalen Temperaturmessgerätes wurde das Aufheizen des Leitungswassers im Bioreaktor aufgezeichnet. Nach ca. 9 Minuten konnte hier ebenfalls ein Erreichen von ca. 37 °C beobachtet werden. Die Temperatur blieb im Anschluss konstant. In einem zweiten Versuch wurde der Bioreaktor erneut mit 4 ml Leitungswasser befüllt und in ein beheiztes Wasserbad gestellt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass eine konstante Temperatur von 37 °C im Reaktor erreicht wird. Das Heizen in einem Wasserbad benötigt keine extra Rollerpumpe und ist energiesparender, weshalb sich für das weitere Vorgehen für diese Variante entschieden wurde.

Im nächsten Schritt wurden dem Bioreaktor zwei weitere Anschlüsse hinzugefügt, durch die bei geschlossenem Deckel CO₂ eingeführt werden kann. Um die Gaszufuhr zu steuern, wurde ein erster Prototyp der Docking-Station aufgebaut, welcher ebenfalls die Temperatursteuerung übernimmt (vgl. Abbildung 57).

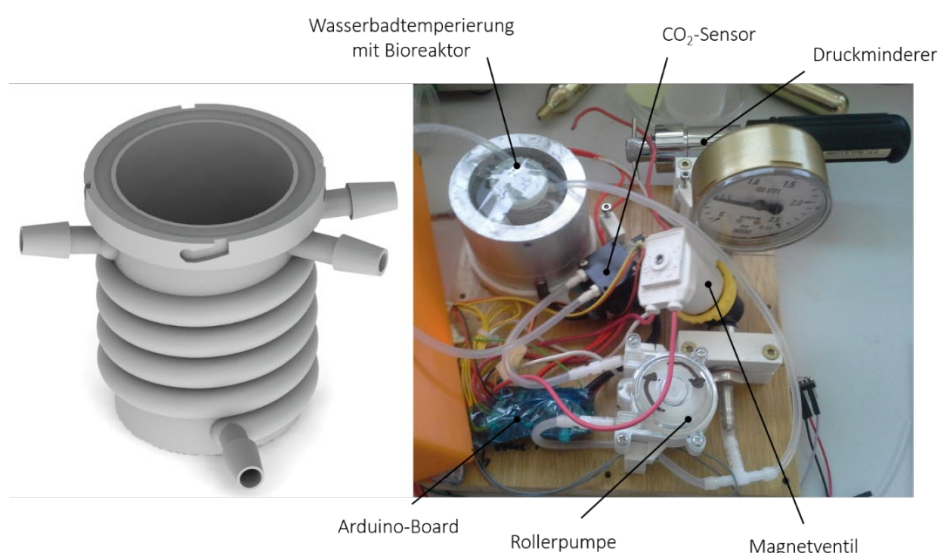


Abbildung 57: Erweiterung des Bioreaktors um zwei weitere Anschlüsse zur Gaszufuhr (links). Dockingstation zur Steuerung der Gaszufuhr und Temperierung (rechts).

Die Dockingstation besteht aus den folgenden Komponenten:

- Druckminderer Keg – Ceomat, G5/8 Zoll (ich-zapfe.de, Deutschland)
- 16g CO₂-Kapseln (ich-zapfe.de, Deutschland)
- Magnetventil, G1/4 Zoll NC direktgesteuert (magnetventile-shop.de, Deutschland)
- Rollerpumpe
- CO₂-Sensor CozIR W 20% (CO2Meter.com, USA)
- Arduino-Board
- Wasserbad-Temperierung (Eigenbau)

Um eine Gaszufuhr im Bioreaktor zu gewährleisten, wurde die Dockingstation mit einem Druckminderer für 16 g-CO₂-Kapseln ausgestattet. Der Inhalt der CO₂-Kapseln ist ausreichend, um den Bioreaktor über mehrere Tage mit CO₂ zu versorgen. Die Gaszufuhr erfolgt pulsweise über ein Magnetventil. Die Regelung des Magnetventils wird in Abhängigkeit des aktuellen CO₂-Gehaltes im Reaktor über ein Arduino-Board geregelt. Zur Messung des aktuellen CO₂-Gehaltes wurde der Bioreaktor an eine Rollerpumpe sowie einen CO₂-Sensor angeschlossen. Über die Rollerpumpe wurde Luft aus dem Bioreaktor in den CO₂-Sensor transportiert, in welchem der CO₂-Gehalt bestimmt wird. Fällt der CO₂-Gehalt unter einen definierten Wert wird das Magnetventil geöffnet, um erneut CO₂ in den Reaktor zu pumpen.

Zur Validierung der CO₂-Begasung wurde folgender Versuch durchgeführt. Der Druckminderer wurde so eingestellt, dass 0,5 bar anliegen. In Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass bereits minimale Öffnungen des Magnetventils einen starken Anstieg des CO₂-Gehaltes bewirken. Für die hier beschriebenen Versuche wurde somit die minimal mögliche Impulsdauer von 10 ms gewählt. Über ca. 48 Stunden wurde alle 5 Sekunden ein Messwert des CO₂-Sensors aufgezeichnet. Die Regelung wurde so eingestellt, dass bei einer Unterschreitung des hier gewählten Grenzwertes von 70000 ppm (entspricht 7 %) das Magnetventil für die eingestellte Impulsdauer öffnet. Abbildung 58 zeigt exemplarisch die Aufzeichnung der CO₂-Konzentration nach einem Impuls bis zu einem Abfall unter den Grenzwert.

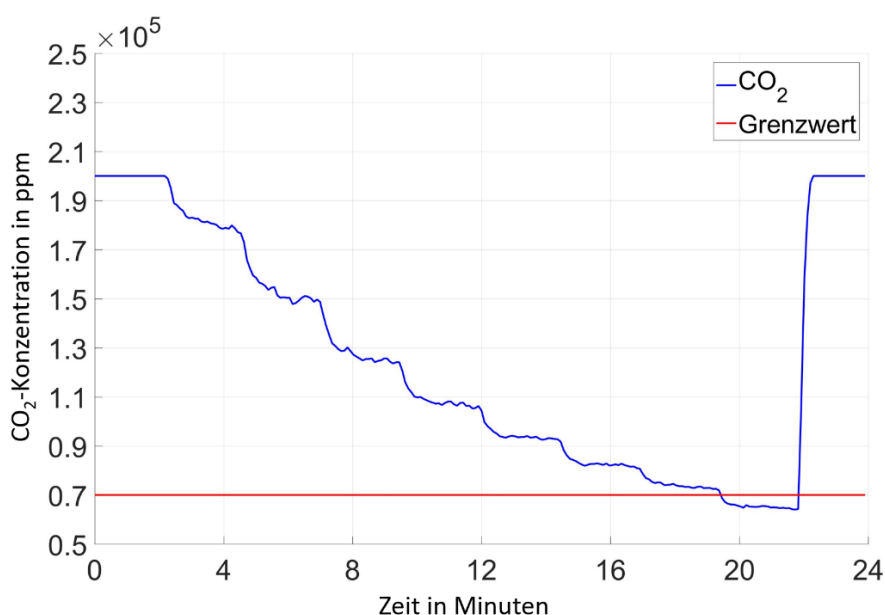


Abbildung 58: Aufzeichnung der CO₂-Konzentration in ppm nach einem Gasimpuls über ca. 24 Minuten.

Nach einem CO₂-Impuls steigt der CO₂-Gehalt sprunghaft auf ca. 20 % an und fällt über ca. 22 Minuten unter den gewählten Grenzwert von 7 % ab. Wie die Auswertung zeigt ist es möglich, den CO₂-Gehalt im Bioreaktor über mehrere Tage konstant zwischen 7 % und 20 % zu halten. Über den CO₂-Gehalt soll der pH-Wert von Zellkulturmedien eingestellt werden.

Ein DMEM Zellkulturmedium weist in der Regel bei 10 % CO₂-Gehalt einen pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 auf. Ob mit der eben beschriebenen Regelung das Zellkulturmedium auf diesem Gehalt gehalten werden kann, sollte durch einen Versuch mit einer pH-Elektrode untersucht werden. Dazu wurde in einem ersten Schritt ein neuer Deckel konstruiert, der es erlaubt eine pH-Elektrode in den Bioreaktor einzubringen. Um bei geschlossenem Deckel eine Luftdichtheit zu gewährleisten wurde der Spaltbereich um die Sonde mit Heißkleber abgedichtet. Für den Validierungsversuch wurde die pH-Elektrode 60120B (Extech Instruments, USA) verwendet (vgl. Abbildung 59).

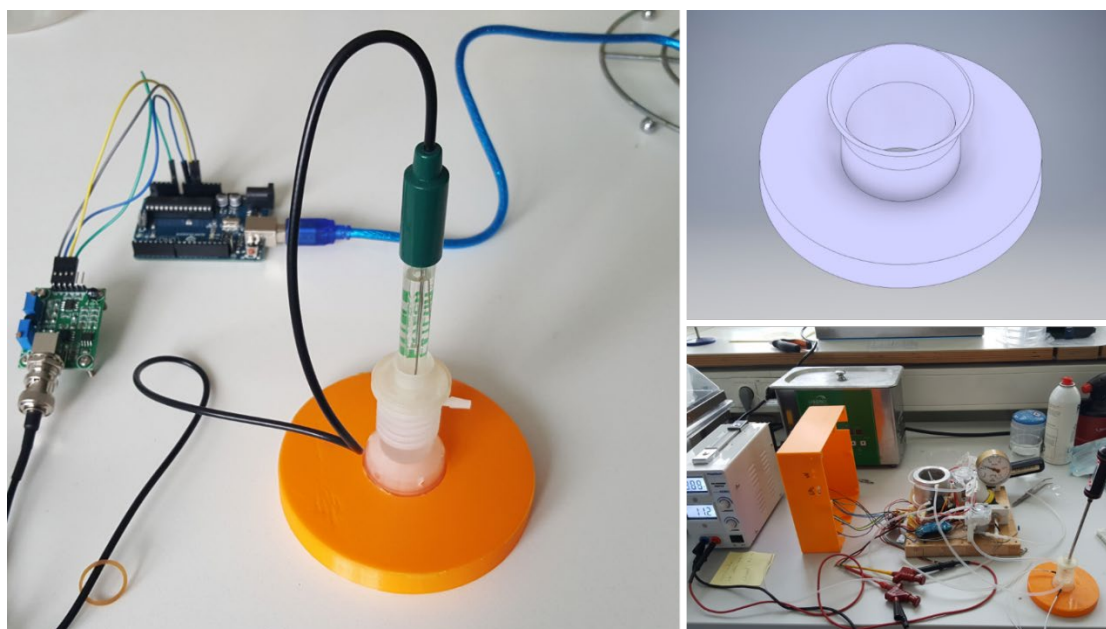


Abbildung 59: Versuchsaufbau zur Messung des pH-Werts des Mediums im inneren des Bioreaktors (links und rechts unten). CAD-Modell des Deckels zum Einbringen der pH-Elektrode in den Bioreaktor (rechts oben).

Zur Kalibrierung der pH-Elektrode wurde eine Pufferlösung mit einem pH-Wert von 4 sowie eine Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7 verwendet. Weiterhin wurde eine Pufferlösung mit einem pH-Wert von 14 zur Überprüfung der Kalibrierung eingesetzt. Für die Durchführung des Versuches wurden im ersten Schritt 4 ml DMEM Zellkulturmedium (Biochrom GmbH, Deutschland) in den Bioreaktor gegeben. Über 4 Tage wurde einmal pro Tag im Abstand von 10 Sekunden 60 Messwerte des pH-Wertes aufgezeichnet.

Abbildung 60 zeigt den Verlauf des pH-Wertes über 4 Tage.

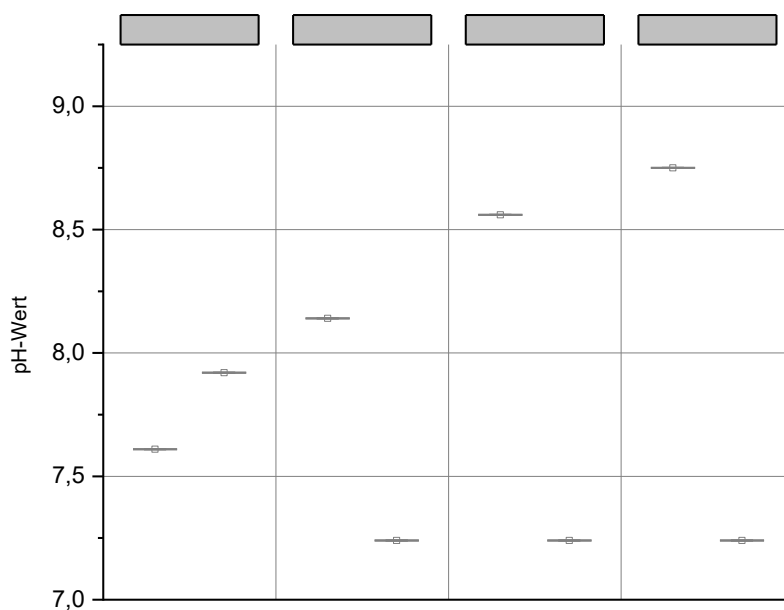


Abbildung 60: pH-Messungen in DMEM über 4 Tage mit und ohne CO₂-Begasung.

Die pH-Messungen von DMEM im Bioreaktor ohne CO₂-Begasung zeigen einen Anstieg des pH-Wertes auf 7,16 nach einem Tag, bzw. auf 8,14, 8,56 sowie 8,75 nach 2 Tagen, 3 Tagen und 4 Tagen. Eine Verschiebung ins basische ist somit deutlich erkennbar. Die Messungen von DMEM im Bioreaktor bei aktivierter CO₂-Begasung zeigen einen kurzzeitigen Anstieg an Tag 1, im Anschluss kann der pH-Wert konstant bei 7,24 gehalten werden. Mit diesem Versuch kann also gezeigt werden, dass die CO₂-Begasung des ersten entwickelten Prototyps funktioniert.

8.3.3 Versuch zur Kultivierung von Fibroblasten

Nachdem erste Versuche bezüglich der Temperierung sowie der Begasung durchgeführt wurden, sollen nun in dem gedruckten Bioreaktor und dem Prototypen der Docking-Station vitale Zellen kultiviert werden, ohne Benutzung weiterer Ausstattung aus einem Biolabor.

Herstellung und Vorbereitung des Bioreaktors

Der im vorherigen Kapitel vorgestellte Bioreaktor wurde mit dem 3D-Drucker ASIGA UV MAX (Asiga, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 100 µm gedruckt. Der gedruckte Bioreaktor wurden händisch mit 99,8 %iger Ethanollösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) gereinigt, um anhaftendes Restphotopolymer zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Reinigung in dem Ultraschallbad Sonorex Super RK 255 H (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) mit ebenfalls 99,8 % iger Ethanollösung für 10 Minuten. Nach der Reinigung wurden der Bioreaktor in der UV-Kammer CD-1 (pro3dure medical GmbH, Deutschland) für 4 Minuten unter Stickstoffatmosphäre ausgehärtet.

Der Boden des Bioreaktors wurde wie in Kapitel 7.5.1 beschrieben nachbehandelt, um eine Transparenz auf der Unterseite zu erhalten.

Der Bioreaktor wurde in einen Sterilisationsbeutel verpackt und mit dem Autoklaven Hospiklav 25-Typ B (Firma SHP Steriltechnik AG, Deutschland) bei 121 °C für 15 Minuten heißdampfsterilisiert.

Durchführung

Zur Durchführung des Versuches wurden Fibroblasten (Hs27) verwendet. Es wurden 2 ml einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von $5000 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$ in die Bioreaktoren gegeben. Als Zellkulturmedium diente DMEM (Biochrom GmbH, Deutschland). Der befüllte Bioreaktor wurde in das Wasserbad der Dockingstation gestellt und an die CO₂-Begasung angeschlossen. Das Wasserbad sorgte für eine konstante Temperierung auf 37 °C. Der Druckminderer wurde so eingestellt, dass 0,5 bar anlagen. Die Regelung wurde so eingestellt, dass bei einer Unterschreitung des Grenzwertes von 70000 ppm (entspricht 7 %) das Magnetventil für 10 ms öffnet und CO₂ in den Reaktor einlässt. Der gesamte Aufbau wurde für 7 Tage in normaler Büroumgebung betrieben.

Ergebnisse und Diskussion

Nach 7 Tagen Kultivierung wurde eine optische Analyse der Zellen durchgeführt. Dazu wurde der Bioreaktor entnommen und die Zellen unter einem Mikroskop bewertet (vgl. Abbildung 61).

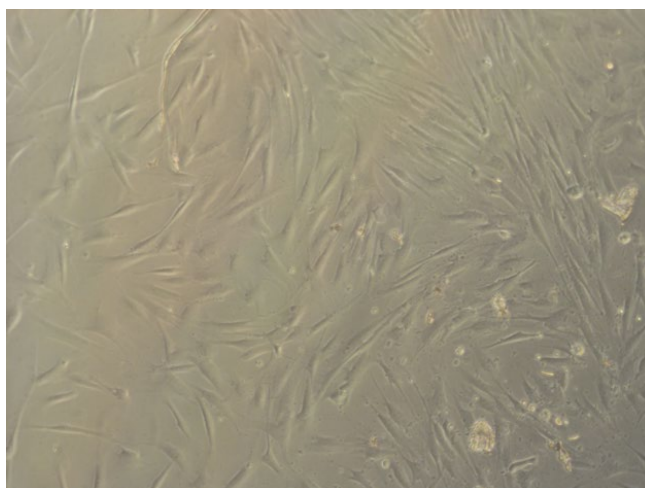


Abbildung 61: Mikroskop-Aufnahme von 7 Tagen kultivierten Fibroblasten in einem ersten Prototyp eines Desktop-Bioreaktorsystems

Die Aufnahme zeigt deutlich adhärenente Fibroblasten. Die Morphologie deutet auf vitale Zellen hin, die sich auf dem Boden des Bioreaktors angesiedelt haben.

8.3.4 Weiterentwicklung des Bioreaktors für Zytotoxizitätstest

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Bioreaktor in Kombination mit der Dockingstation geeignet ist, um Zellen außerhalb eines Biolabors zu kultivieren, wurde im nächsten Schritt eine Optimierung des Bioreaktors durchgeführt, um mit diesem Zytotoxizitätsuntersuchungen durchzuführen. Wie bereits am Anfang dieses Kapitels beschrieben, basiert die Grundidee auf einer Parallelisierung der Proliferation und Elution, um bei der Zytotoxizitätsuntersuchung Zeit einzusparen. Ein weiterer Punkt zur Verbesserung war das Handling des Reaktors. Insgesamt sollten folgende Punkte in das neue Design einfließen:

- Neues Verschlusssystem für schnelleres Verschließen
- Entfernen der Heizspirale, da externe Beheizung bevorzugt wurde
- Gitterstruktur zur Auflage von Prüfprobekörpern ohne dass diese adhärenente Zellen berühren

Ein besonderer Fokus wurde auf die Auslegung der Gitterstruktur im inneren des Bioreaktors gelegt. Diese hat zur Aufgabe, den Probekörper zur Zytotoxizitätsuntersuchung zu positionieren, sodass potenziell herauslösbare Bestandteile mit Zellen interagieren können, die Prüfkörper die Zellen aber nicht mechanische beeinflussen. Daraus ergeben sich folgende Anforderungen an die Gitterstruktur:

- Möglichst geringe Auflagefläche, um die Elutions-Oberfläche des Prüfkörpers nicht zu beeinflussen.
- Größte offene Flächen zwischen den Gitterlinien muss signifikant kleiner sein als Prüfkörper, damit diese nicht durch das Gitter fallen.
- Höhe der Gitterstruktur muss so definiert sein, damit Prüfkörper vollständig mit Elutions-Medium bedeckt ist und Oberflächen-Volumen-Verhältnis aus der Norm DIN EN ISO 10993 eingehalten wird.

Abbildung 62 zeigt die gewählte Gitterstruktur, um Punkt 1 und 2 der Anforderungen zu erfüllen.

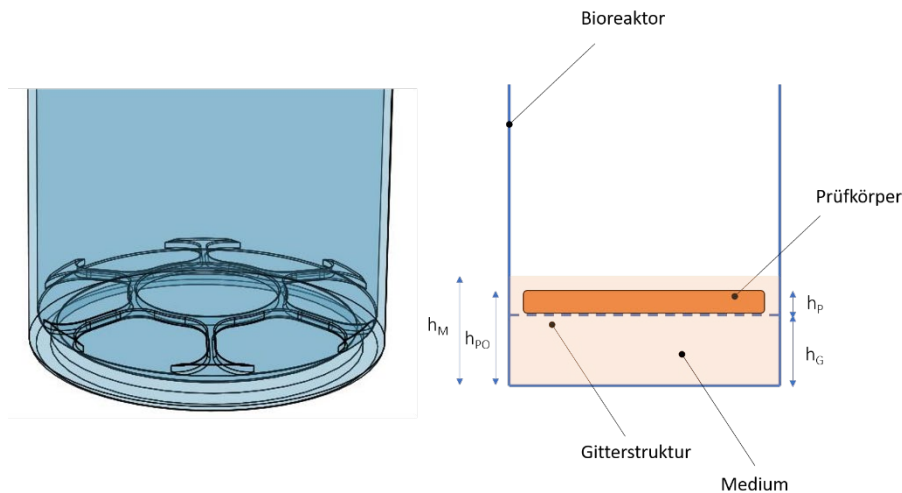


Abbildung 62: CAD-Modell der Gitterstruktur im inneren des Bioreaktors zum Aufliegen des Prüfkörpers (links). Schematische Darstellung zur Berechnung der Gitterhöhe (rechts).

Die optimale Höhe der Gitterstruktur wurde berechnet mit folgenden Annahmen. Die Gitterposition ist abhängig von dem in der Norm DIN EN ISO 10993 geforderten Oberflächen-Volumen-Verhältnis für die Extraktion (r_e) welches wie folgt definiert ist:

$$r_e = \frac{S_P}{V_e} \quad (9)$$

mit S_P = Oberfläche des Prüfkörpers und V_e Volumen des Extraktionsmediums.

In der Norm DIN EN ISO 10993 ist r_e mit $3 \frac{cm^2}{ml}$ definiert. Das bisherige Bioreaktordesign war rund, weshalb sich auch für runde Prüfkörper entschieden wurde. Die Oberfläche des Prüfkörpers S_P ist somit definiert als:

$$S_P = \pi \cdot d_P \cdot \left(\frac{d_P}{2} + h_P \right) \quad (10)$$

mit d_P = Durchmesser des Prüfkörpers und h_P = Höhe des Prüfkörpers.

Betrachtet man das benötigte Volumen des Extraktionsmedium im Bioreaktor, kann so die Füllstandshöhe des Mediums h_M berechnet werden.

$$V_e = \pi \cdot h_M \cdot \frac{d_{BRI}^2}{4} \rightarrow h_M = \frac{4 \cdot V_e}{\pi \cdot d_{BRI}^2} \quad (11)$$

mit d_{BRI} = Innendurchmesser des Bioreaktors.

Die Füllstandshöhe nach Einlegen des Prüfkörpers wird durch die Verdrängung des Volumens des Prüfkörpers ansteigen, was für diese Berechnung jedoch vernachlässigbar ist. Die Position der Prüfkörperoberfläche h_{PO} (liegend auf dem Gitter) muss niedriger sein als die Füllstandshöhe h_M , damit der Prüfkörper komplett mit Elutionsmedium bedeckt ist. h_{PO} lässt sich berechnen mit:

$$h_{PO} = h_G + h_p \quad (12)$$

mit h_G = Höhe der Gitterstruktur.

Wie bereits erwähnt muss für ein vollständiges Bedecken des Prüfkörpers $h_M > h_{PO}$ gelten. Dieser Abstand wird mit Δh bezeichnet und lässt sich wie folgt berechnen:

$$\Delta h = h_M - h_{PO} \quad (13)$$

Werden die Gleichungen kombiniert und nach h_G aufgelöst lässt sich für die Gitterhöhe folgende Gleichung aufstellen:

$$h_G = \frac{4 \cdot d_p \cdot \left(\frac{d_p}{2} + h_p\right)}{r_e \cdot d_{BRI}^2} - \Delta h - h_p \quad (14)$$

Für die finale Auslegung des Reaktors wurde versucht, so wenig Material wie nötig zu benötigen, weshalb schrittweise in Experimenten die Wandstärken des Reaktors reduziert wurden. Der finale Innendurchmesser des Reaktors wurde somit auf 23,8 mm festgelegt. Für den Pufferabstand Δh wurde 1 mm als ausreichend befunden. Als Prüfkörpergeometrie wurde sich für Plättchen mit einem Durchmesser von 18 mm und einer Höhe von 1 mm entschieden. Zusammenfassend wurden folgende Werte für die Berechnung der Gitterhöhe nach Gleichung 14 verwendet:

Tabelle 16: Variablen und Werte zur Berechnung der Gitterhöhe im Bioreaktor

Variable	d_p	h_p	r_e	Δh	d_{BRi}
Wert	18 mm	1 mm	$3 \frac{cm^2}{ml}$	1 mm	23,8 mm

Die berechnete Gitterhöhe betrug somit gerundet 2,24 mm. Das benötigte Volumen an Elutionsmedium berechnete sich zu 1885 μ l.

Neben der Berechnung der Gitterhöhe flossen noch weitere Designelemente in die Weiterentwicklung des Bioreaktors für die Durchführung von Zytotoxizitätstests ein. Diese werden im Folgenden beschrieben (vgl. Abbildung 63).

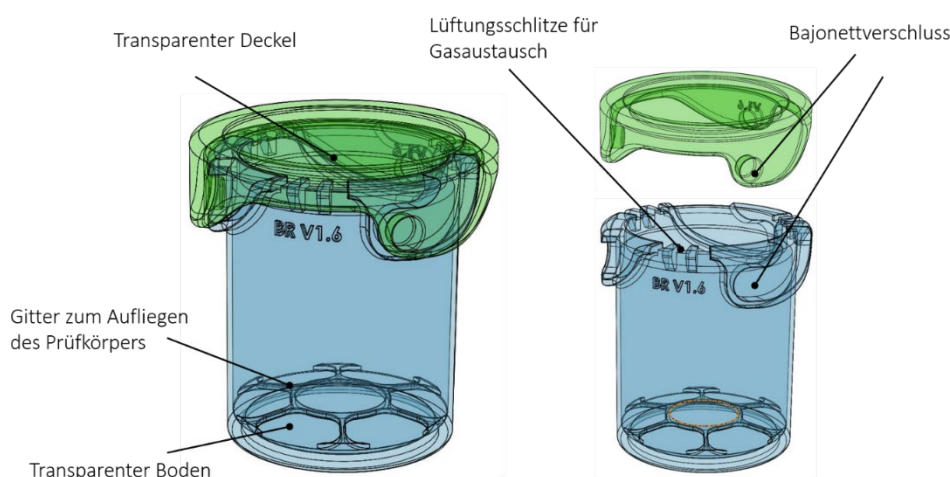


Abbildung 63: CAD-Modell des weiterentwickelten Bioreaktors zur Durchführung von Zytotoxizitätsuntersuchungen.

Wie Abbildung 63 zu entnehmen ist, wurde der Deckel mit einem Bajonettverschluss für ein schnelleres Öffnen und Verschließen ausgestattet. Das Gitter im Inneren des Bioreaktors wurde leicht angeschrägt, für eine bessere Druckbarkeit ohne Stützstrukturen. Weiterhin weist der Bioreaktor einen transparenten Deckel sowie einen transparenten Boden auf. Die Transparenz wurde erneut durch die bereits beschriebene Nachbearbeitung erreicht. Die Heizspiralen des vorherigen Designs wurden entfernt. Weiterhin wurden für erste Versuche die Begasungsanschlüsse entfernt und stattdessen Lüftungsschlitze angebracht. Dieses hatte den Hintergrund, dass die ersten Zytotoxizitätsuntersuchungen mit dem Bioreaktor in einem Inkubator stattfinden sollten, da der Prototyp der Dockingstation nur einen Reaktor mit CO₂ versorgen konnte.

8.3.5 Zytotoxizitätsuntersuchungen mit dem neu entwickelten Bioreaktor

Mit dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Bioreaktor wurde ein Versuch durchgeführt, um die Eignung zur Durchführung von Zytotoxizitätsuntersuchungen zu untersuchen. Die Zytotoxizitätsuntersuchungen wurden in Anlehnung an die Norm DIN EN ISO 10993 durchgeführt. Als Prüfkörper wurde der Kunststoff PEEK, der bekanntlich biokompatibel ist, verwendet, sowie Kupfer als Positivkontrolle, um zu überprüfen, ob der Test bei zytotoxischen Werkstoffen anschlägt.

Herstellung des Bioreaktors und der Prüfkörper

Der im Kapitel 8.3.4 vorgestellte Bioreaktor wurde in fünffacher Ausführung mit dem 3D-Drucker ASIGA UV MAX (Asiga, Deutschland) mit einer Schichtdicke von 100 µm gedruckt. Die gedruckten Bioreaktoren wurden händisch mit 99,8 %iger Ethanollösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) gereinigt, um anhaftendes Restphotopolymer zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Reinigung in dem Ultraschallbad Sonorex Super RK 255 H (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland) mit ebenfalls 99,8 % iger Ethanollösung für 10 Minuten. Nach der Reinigung wurden die Bioreaktoren in der UV-Kammer CD-1 (pro3dure medical GmbH, Deutschland) für 4 Minuten unter Stickstoffatmosphäre ausgehärtet. Die Böden sowie die Deckel der Bioreaktoren wurden wie in Kapitel 7.5.1 beschrieben nachbehandelt, um eine Transparenz zu erhalten. Die Bioreaktoren wurden in einen Sterilisationsbeutel verpackt und mit dem Autoklaven Hospiklav 25-Typ B (SHP Steriltechnik AG, Deutschland) bei 121 °C für 15 Minuten heißdampfsterilisiert.

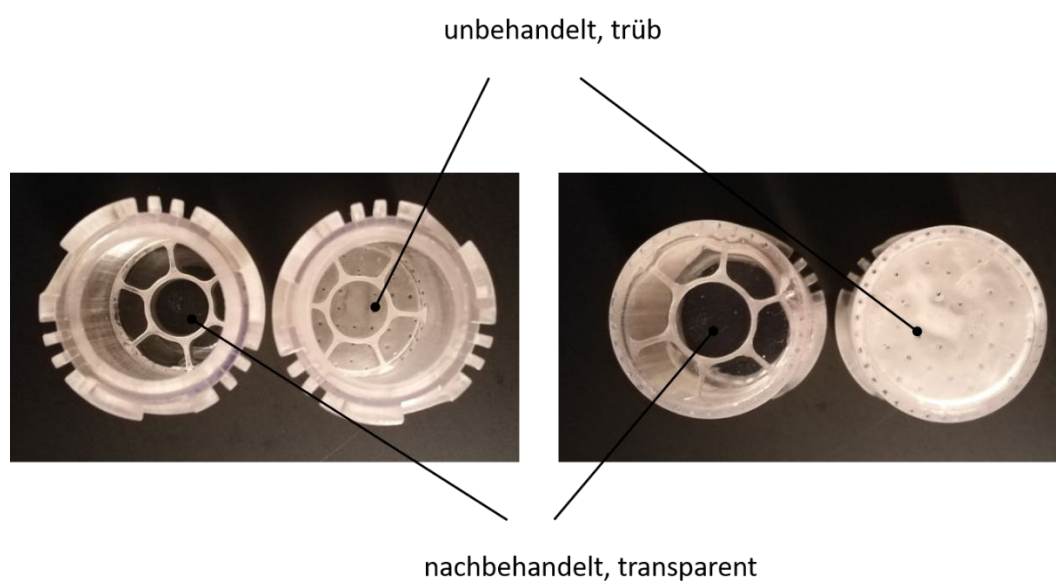


Abbildung 64: Bioreaktoren für die Zytotoxizitätsuntersuchungen vor und nach der Oberflächenbehandlung.

Abbildung 64 zeigt die gedruckten Bioreaktoren vor und nach der Oberflächenbehandlung. Direkt nach dem Druck ist der trübe Boden bzw. trübe Deckel zu erkennen. Nach der Oberflächenbehandlung ist hier eine Transparenz deutlich zu sehen.

Prüfkörper aus PEEK wurden freundlicherweise von der Firma Kumovis GmbH mittels 3D-Druck im FLM-Verfahren hergestellt und zur Verfügung gestellt. Die Prüfkörper wiesen einen Durchmesser von 18 mm und eine Dicke von 1 mm auf. Als Positivkontrolle dienten Kupferplättchen in den gleichen Maßen. Auch die Prüfkörper wurden in Sterilisationsbeutel verpackt und mit dem Autoklaven Hospiklav 25-Typ B (SHP Steriltechnik AG, Deutschland) bei 121 °C für 15 Minuten heißdampfsterilisiert.

Durchführung

Für die Durchführung von Zytotoxizitätsuntersuchungen mit $n=5$, einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle wurden insgesamt 7 Bioreaktoren verwendet. Als Zellen wurden Fibroblasten (Hs27) genutzt. In jeden Bioreaktor wurden 1885 μl einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von $10.000 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$ gegeben. Als Zellkulturmedium diente DMEM (Biochrom GmbH, Deutschland). Abbildung 65 zeigt den Versuchsaufbau.



Abbildung 65: Versuchsaufbau zur Untersuchung, ob mit den selbst entwickelten 3D-gedruckten Bioreaktoren Zytotoxizitätsuntersuchungen durchgeführt werden können.

Die Bioreaktoren wurden im Anschluss für 24 Stunden im Inkubator CB 150 (Binder GmbH, Deutschland) bei 37 °C und 10 % CO₂-Gehalt inkubiert. Nach den 24 Stunden Inkubation wurden die Prüfkörper sowie die Negativkontrolle in jeweils einen Bioreaktor überführt, bevor eine weitere Inkubation für 72 Stunden stattfand. Zur Auswertung wurde ein WST-Test, wie bereits im Rahmen dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Auswertung erfolgte nach der Norm DIN EN ISO 10993-5. Ein Rückgang der Proliferationsrate von über 30 % referenziert auf die Negativkontrolle wird als zytotoxische Reaktion bewertet.

Für die Auswertung wurden als statistische Größen der Minimal- und Maximalwert, Median, sowie das 25 % und 75 % Quantil ermittelt. Die jeweiligen Werte innerhalb einer Gruppe wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf ihre Normalverteilung überprüft. Eine Normalverteilung kann in keinem der Fälle zurückgewiesen werden. Mit Hilfe des t-Tests wurden die Mittelwerte der Gruppen gegenüber dem Testmittelwert 70 % (Zytotoxizitätsgrenze) verglichen. Die Darstellung erfolgt über Boxplots mit $n=5$ und $*=p\leq 0,05$.

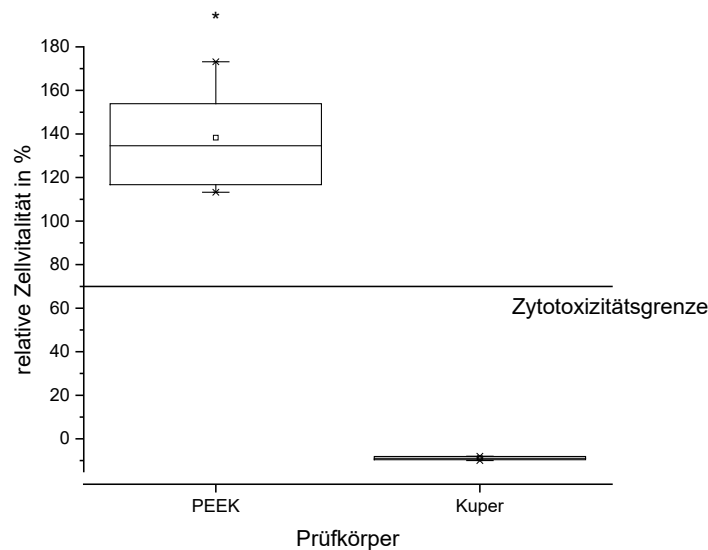


Abbildung 66: Auswertung durchgeführter Zytotoxizitätsuntersuchungen der in den selbst entwickelten, 3D-gedruckten Bioreaktoren kultivierter Zellen.

Abbildung 66 zeigt, dass bei den PEEK Prüfkörpern keine zytotoxischen Effekte beobachtet werden konnten. Bei den Prüfkörpern aus Kupfer hingegen kann deutlich ein zytotoxischer Effekt gesehen werden. Grundsätzlich kann somit gezeigt werden, dass eine Untersuchung auf Zytotoxizität mit dem neuen Verfahren in den gedruckten Bioreaktoren möglich ist. Es ist jedoch zu sehen, dass die Standardabweichung bei den PEEK Prüfkörpern noch relativ groß ist. Dies kann eventuell an Pipettierfehlern liegen oder an einem ungleichmäßigem Anwachsverhalten an den Böden der Reaktoren innerhalb der ersten 24 Stunden.

8.3.6 Weiterentwicklung der Dockingstation und Ausblick

Nachdem im bisherigen Kapitel gezeigt wurde, dass außerhalb eines Biolabors mit Hilfe selbst gedruckter Bioreaktoren sowie der Dockingstation biologische Versuche durchgeführt werden können sowie die Durchführung von Zytotoxizitätsuntersuchungen mit den 3D-gedruckten Bioreaktoren möglich ist, wird abschließend eine finale Weiterentwicklung der Reaktoren sowie der Dockingstation beschrieben.

Abbildung 67 zeigt das CAD-Modell des finalen Bioreaktordesigns.

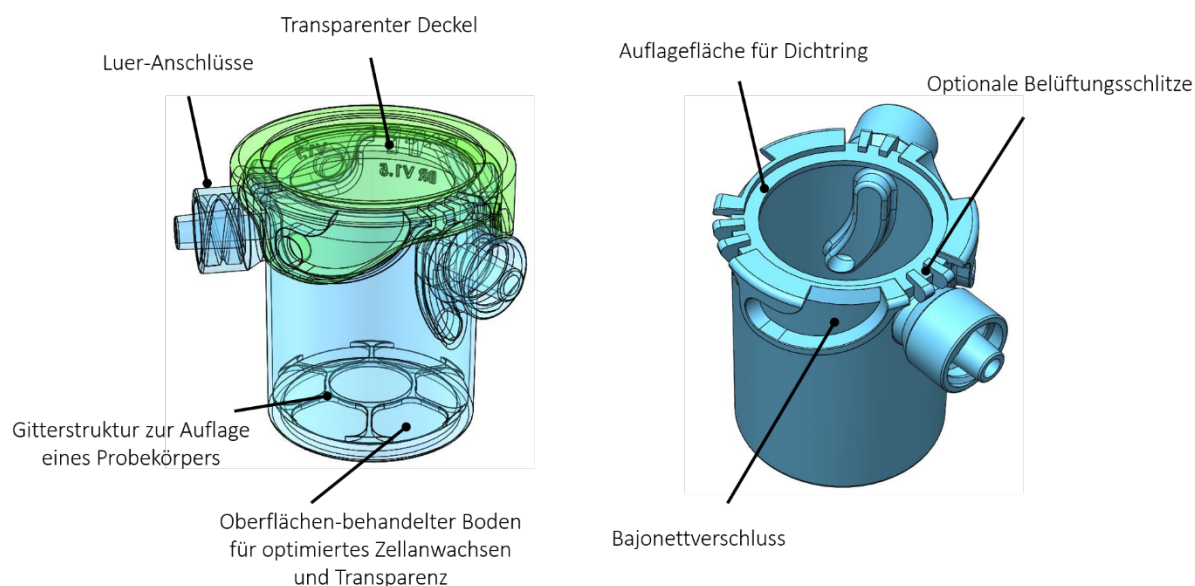


Abbildung 67: CAD-Modell des finalen Bioreaktordesigns für ein Desktop-System zur Zellkultivierung sowie der Durchführung von *in-vitro* Tests.

Dem Bioreaktor wurden Luer-Anschlüsse hinzugefügt, um eine Begasung über einen standardisierten Anschluss zu ermöglichen. Weiterhin wurde eine Auflagefläche für einen Dichtring konstruiert, die ermöglichen soll, bei eingelegtem Dichtring die Belüftungsschlitze zu verschließen. So kann hier kein Gasaustausch stattfinden, wenn der Bioreaktor über die Dockingstation betrieben wird. Einer optionalen Verwendung des Reaktors im Inkubator steht jedoch nichts im Weg, da ohne den Dichtring weiterhin ein Gasaustausch über die Lüftungsschlitze stattfinden kann.

Weiterhin wurde im Rahmen der Masterarbeit von Mario Reidl ein CAD-Modell eines finalen Desktop-Systems zur Kultivierung von Zellen sowie zur Durchführung von *in-vitro* Tests erstellt. Das System ist in der Lage 5 Bioreaktoren parallel zu versorgen und verfügt über eine Gasversorgung sowie Temperiereinheiten.

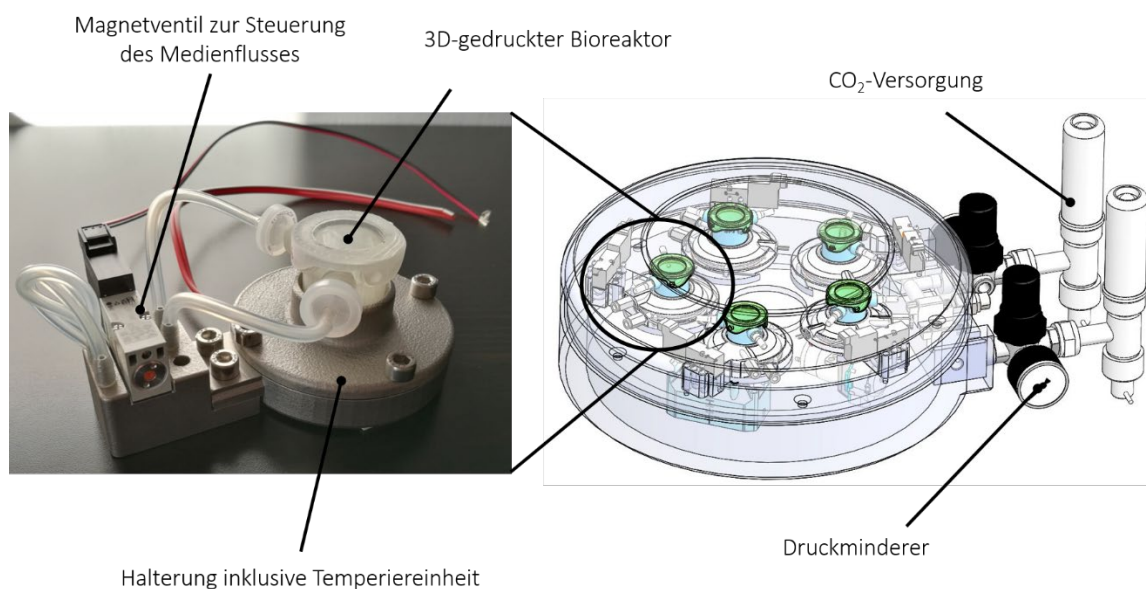


Abbildung 68: Bioreaktoreinheit inklusive Magnetventil zur Steuerung des Gasflusses und Temperiereinheit (links). CAD-Modell des finalen Desktop-Systems zur Ansteuerung von 5 Bioreaktoreinheiten (rechts).

Die Ansteuerung der Begasung erfolgt über ein 4/2 Wegeventil, das eine präzisere Begasung erlaubt. Die Halterung des Bioreaktors enthält eine Heizfolie, die eine Temperierung des Reaktors ermöglicht. Das Gehäuse der Halterung des Bioreaktors wurde mit freundlicher Unterstützung der Firma EOS mittels SLS-Verfahren additiv hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte lediglich eine Bioreaktoreinheit fertiggestellt werden. Die Dockingstation zum parallelen Betreiben von 5 Reaktoren wurde nur im CAD-Modell fertiggestellt und konnte aufgrund fehlender Ressourcen im Rahmen dieses Projektes nicht in einen physischen Prototyp überführt werden.

Wie in Kapitel 8.3 beschrieben konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der additiven Fertigung und des im Rahmen dieser Arbeit optimierten Photopolymers ein Bioreaktor entwickelt werden konnte, mit dem sich Zytotoxizitätstest durchführen lassen. Die additive Fertigung ermöglichte es innerhalb kurzer Zeit verschiedene Iterationen des Bioreaktordesigns zu fertigen und zu testen. Auch ein erster Prototyp zur Begasung und Temperierung des Bioreaktors außerhalb eines Biolabors konnte gefertigt werden. Um final außerhalb eines Biolabors Zytotoxizitätsuntersuchungen mit Hilfe eines Desktop-Systems sind jedoch noch weitere Entwicklungsschritte durchzuführen. Vor allem das Handling von Prüfkörpern außerhalb eines Biolabors, sowie das Handling von Flüssigkeiten (Medium, WST-Prüfmedium) sind ungelöste Problematiken. Ein Team am Lehrstuhl für medizintechnische Materialien und Implantate bewarb sich zur Fortführung dieser Idee für den Medical Valley Award. Es gelang in die finale Auswahlrunde zu gelangen, führte jedoch aufgrund eines noch fehlenden Kommerzialisierungsplan zu keiner Förderung. Das Potential wurde jedoch als sehr vielversprechend eingestuft.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Die additive Fertigung bietet großes Potential für die Entwicklung und Fertigung neuartiger Bioreaktorsysteme. Einsatzgebiete können beispielsweise das Tissueengineering oder *in-vitro* Testsysteme sein. Spezialisierte Bioreaktoren werden aktuell in der Regel mittels abtragender Technologien, wie beispielsweise dem Fräsen hergestellt. Auf Grund der limitierten Designfreiheit können so jedoch Geometrien wie Hinterschnitte, Kanalsysteme oder komplexe Freiformflächen nicht hergestellt werden. Weiterhin ist eine wirtschaftliche Fertigung von größeren Stückzahlen spezialisierter Bioreaktoren mittels Fräsen in der Regel nicht realisierbar.

Mit Hilfe des 3D-Drucks kann es ermöglicht werden, Bioreaktoren zukünftig ohne Design-Restriktionen schnell und kostengünstig zu fertigen. Auf Grund des steigenden Angebotes an Desktop-3D-Druckern, besonders im Bereich der DLP-Technologie, ist eine Produktion direkt im Labor denkbar, die einen neuen Zugang zur Fertigung von Bioreaktoren schafft. Wie der im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Stand der Technik zeigt, sind aktuell vor allem geeignete Werkstoffe der limitierende Faktor. Folgende Anforderungen müssen grundlegend erfüllt werden, um den Einsatz der additiven Fertigung zur Herstellung von Bioreaktoren zu ermöglichen:

- Biokompatibilität im Langzeitkontakt mit biologischem Gewebe
- Beständigkeit gegenüber Sterilisationsmethoden wie der Heißdampfsterilisation
- Transparenz an definierten Stellen
- Mechanische Stabilität 3D-gedruckter Objekte
- Geeignete Auflösung der 3D-Drucktechnologie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich für das Digital Light Processing entschieden, da andere Verfahren wie das Selektive Lasersintern, Multijet-Modeling oder Fused Layer Modeling als nicht geeignet eingestuft wurden. Für das DLP-Verfahren sind Photopolymere kommerziell erwerblich, welche für medizinischen Anwendungen der Klasse IIa zugelassen sind. Diese Werkstoffe sind jedoch für den Einsatz in der Dentalbranche entwickelt worden. Der Stand der Technik zeigt auf, dass diese für die Fertigung von Systemen, die im Kontakt mit biologischem Gewebe stehen, in der Regel nicht geeignet sind.

Ziel dieser Arbeit war es ein Photopolymer hinsichtlich seiner herauslösbaren Bestandteile zu charakterisieren und chemisch so zu optimieren, dass es für den Langzeiteinsatz mit biologischen Systemen geeignet ist. Weiterhin wurde an einer Technik gearbeitet, um transparente Bereiche an definierten Stellen zu erreichen. Abschließend wurde das optimierte Photopolymer im realen Einsatz validiert.

Im ersten Schritt wurden die Hauptbestandteile herauslösbarer Bestandteile mittels High-Performance-Liquid-Chromatographie und Massenspektrometrie bestimmt, da diese zytotoxische Reaktionen auslösen können. Als Hauptbestandteil wurden unvernetzte Restmonomere bestimmt. Um das Photopolymer für den Langzeiteinsatz nutzen zu können,

war es das Ziel die herauslösbaren Bestandteile auf ein Minimum zu reduzieren. Um dies zu realisieren, wurde die Anzahl von Oxyethylengruppen, welche in die Grundmonomere eingebracht sind, modifiziert, um die Kettenlänge zu verändern. Durch eine Verkürzung der Kettenlänge konnte die Menge der herauslösbaren Bestandteile signifikant beeinflusst werden. Es wurde eine optimale Synthese gefunden, mit der auch nach 30 Tagen keine zytotoxischen Reaktionen im Kontakt mit biologischem Gewebe beobachtet werden konnte. Dies konnte in Zellkultur-Experimenten mit verschiedenen Zelllinien (Fibroblasten, Osteoblasten und Endothelzellen) gezeigt werden.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode erarbeitet, die es ermöglicht, mit Hilfe einer Tröpfchen-Beschichtung mit dem optimierten Photopolymer eine Transparenz an definierten Stellen zu erzeugen. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten mit einem Mikroskop durch gedruckte Probekörper beobachtbar sind. Zusätzlich ließ sich durch die Beschichtung der Kontaktwinkel der Oberfläche signifikant reduzieren. Der Kontaktwinkel hat einen maßgeblichen Einfluss auf das Anwachsverhalten von Zellen. Ein geringer Kontaktwinkel begünstigt in der Regel das Anwachsverhalten. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf beschichteten Oberflächen Zellen adhäreren und proliferieren.

Zur Bestimmung der Beständigkeit gegenüber der Heißdampfsterilisation wurden mechanische Untersuchungen an sterilisierten und nicht-sterilisierten Referenzproben durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Änderungen der mechanischen Kennwerte beobachtet werden, weshalb das optimierte Photopolymer als beständig gegenüber der Heißdampfsterilisation gesehen wird.

Nachdem in biologischen Experimenten gezeigt werden konnte, dass das optimierte Photopolymer im Langzeiteinsatz keine zytotoxischen Eigenschaften aufweist, wurde es im realen Einsatz getestet. In Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Translationszentrum Regenerative Therapien für Krebs- und Muskuloskelettale Erkrankungen (TZKME) wurde ein gedruckter Bioreaktor für die optimierte Lagerung von Cornea-Gewebe entwickelt und im realen Einsatz getestet. Der Bioreaktor wurde so konstruiert, dass er den Innendruck des menschlichen Auges simuliert sowie abwechselnd eine wässrige Atmosphäre oder Gasatmosphäre zur Verfügung stellen kann. Dies hatte das Ziel den menschlichen Lidschlag nachzubilden. In biologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Lagerung von tierischem Cornea-Gewebe im 3D-gedruckten Bioreaktor zu besseren Ergebnissen führte als statisch gelagerte. Durch die optimierten Lagerbedingungen konnte das Epithelgewebe der Cornea erhalten bleiben, was bei einer statischen Lagerung nicht möglich war.

In einem eigenen Ansatz wurde ein Konzept für ein Bioreaktorsystem entwickelt, mit dem sich Zytotoxizitätstest ohne biologisches Labor durchführen lassen. Dazu wurde ein erster Prototyp des Bioreaktors sowie einer zugehörigen „Dockingstation“ entwickelt. Mit dem Bioreaktor wurden Zytotoxizitätstests mit gedruckten PEEK-Proben sowie Kupferproben als Positivkontrolle durchgeführt. Weiterhin wurde mit dem ersten Prototyp erfolgreich gezeigt,

dass Zellen auf einem Schreibtisch außerhalb eines Biolabors für 7 Tage kultiviert werden konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die biologische Verträglichkeit anhand von Zytotoxizitätstest bestimmt. Betrachtet man den gesamten Zulassungsprozess eines neuen Werkstoffes für die Medizintechnik sind jedoch Zytotoxizitätsuntersuchungen nur ein Teil der in der Norm DIN EN ISO 10993 verlangten Tests. Soll das im Rahmen dieser Arbeit optimierte Photopolymer kommerzialisiert und zugelassen werden, müssen noch weitere Tests wie Sensibilisierung, Genotoxizitäts-Untersuchungen oder Hämokompatibilitäts-Untersuchungen durchgeführt werden.

Ein weiterer Aspekt, den es für eine kommerzielle Translation an den Patienten zu diskutieren gibt, ist die Prozessvalidierung sowie eine notwendige Produktionsumgebung. Die additive Fertigung hat erst seit kurzem größere Beachtung als ein geeignetes Produktionsverfahren in der Medizintechnik erhalten. Aktuelle Maschinen, wie auch das im Rahmen dieser Arbeit verwendete System, weisen noch keine geeignete Möglichkeit zur Dokumentation des Fertigungsprozesses auf. Dazu sind in der Regel teure speicherprogrammierbare Steuerungen (SPS) nötig. Diese kosten jedoch bereits in einfacher Ausführung bis zu 10.000 Euro, was teilweise bereits den Maschinenpreis einer DLP-Anlage übersteigt. Solche Systeme in Kombination mit geeigneten Sensoren sind jedoch nötig, um notwendige Schnittstellen wie beispielsweise OPC-UA Schnittstellen zur Verfügung zu stellen. Weiterhin muss auch die Produktionsumgebung kritisch betrachtet werden. Da in der additiven Fertigung Bauteile schichtweise aufgebaut werden, besteht die Gefahr, zwischen die jeweiligen Schichten Fremdpartikel einzubringen. Solche Kontaminationen müssen vermieden werden. Die Produktion in einem Reinraum kann diese Problematik lösen. Die Firma Dreigeist GbR bietet als eine der ersten Firmen eine Auftragsfertigung für Dentalanwendungen sowie Applikatoren für die Brachytherapie in Reinraumumgebung an.

Ein anderer Ansatz wäre es, die Reinraumumgebung in der Anlage selbst zu erzeugen. Dies kann gelingen, in dem ein Gehäuse konstruiert wird, welches mit Hilfe eines gefilterten laminaren Luftstroms für eine partikellose Umgebung sorgt. Die Realisierbarkeit eines solchen Konzepts konnte bereits von der Firma Kumovis (Ausgründung im Rahmen eines EXIST Forschungstransfers) an FDM-Druckern erfolgreich gezeigt werden.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Übertragbarkeit der hier gezeigten Ergebnisse auf andere Photopolymer-Typen. Das hier verwendete Photopolymer basierte auf Bisphenol-A-Dimethacrylat als Basismonomer. Andere am Markt erhältlichen Photopolymere basieren unter anderem auch auf Epoxidharzen oder Urethanen. Die Firma Carbon bietet ein 2-Komponenten-Werkstoff auf Polyurethanbasis kommerziell an. Dieser Werkstoff benötigt keine Aushärtung in einer UV-Kammer jedoch eine thermische Nachbehandlung. So wird eine zweite chemische Reaktion hervorgerufen, um die finalen Eigenschaften des Photopolymers zu erzeugen. Es konnte jedoch noch keine Tauglichkeit für den Einsatz in der Medizintechnik gezeigt werden.

Eine Übertragung auf Photopolymersysteme wie sie beispielsweise die Firma Carbon oder weitere Firmen anbietet, gilt es somit zu untersuchen.

Als letzter Diskussionspunkt soll auf das Thema Transparenz eingegangen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transparenz durch eine Nachbearbeitung erreicht. Durch weitere Optimierungen der Werkstoffe sowie der 3D-Druck Prozesse kann es zukünftig möglich sein, auch ohne zusätzliche Nachbearbeitung Transparenz zu erzeugen. Die Firma DSM arbeitet bereits an diesem Thema und bietet mit dem Werkstoff Somos® WaterClear Ultra 10122 ein Material an, welches direkt nach dem Drucken eine Transparenz aufweisen soll. Leider konnten bisher noch keine Bauteile betrachtet werden. Weiterhin ist der Werkstoff nicht für die Medizintechnik geeignet.

Abschließend soll ein Ausblick basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit gegeben werden. Die realen Anwendungen konnten das Potential der Verwendung des optimierten Photopolymers aufzeigen. Der Bioreaktor zur Lagerung von Cornea-Gewebe soll in weiteren Arbeiten und Forschungsprojekten weiterentwickelt werden. Vor allem die Integration von Sensorik für eine in-line Überwachung des biologischen Gewebes soll im Fokus der Forschung stehen. Beispielsweise sei hier die Integration von Drucksensoren, Temperatursensoren oder Beschleunigungssensoren genannt. So können Bioreaktorsysteme entwickelt werden, die neben optimalen Kultivierungsbedingungen auch eine optimale Überwachung des Systems ermöglichen.

Ebenfalls ein großes Potential bringt das vorgestellte Konzept des Bioreaktorsystems zur Durchführung von Zytotoxizitätstests ohne Biolabor mit sich. Ein Proof-of-Concept konnte bereits geliefert werden, sodass sich das Konzept eignet, einen EXIST Forschungstransfer oder ein ähnliches Förderprogramm zu beantragen, um es zu einer kommerzialisierbaren Lösung weiterzuentwickeln.

Literaturverzeichnis

Abdullah, N. and D. Das (2007). "Modelling nutrient transport in hollow fibre membrane bioreactor for growing bone tissue with consideration of multi-component interactions." Chemical engineering science 62(21): 5821-5839.

Abu-Absi, N. R., B. M. Kenty, M. E. Cuellar, M. C. Borys, S. Sakhamuri, D. J. Strachan, M. C. Hausladen and Z. J. Li (2011). "Real time monitoring of multiple parameters in mammalian cell culture bioreactors using an in-line Raman spectroscopy probe." Biotechnology and bioengineering 108(5): 1215-1221.

Alvarez-Barreto, J. F., S. M. Linehan, R. L. Shambaugh and V. I. Sikavitsas (2007). "Flow perfusion improves seeding of tissue engineering scaffolds with different architectures." Annals of biomedical engineering 35(3): 429-442.

Alvarez-Barreto, J. F., B. Landy, S. VanGordon, L. Place, P. L. DeAngelis and V. I. Sikavitsas (2011). "Enhanced osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells seeded in RGD-functionalized PLLA scaffolds and cultured in a flow perfusion bioreactor." Journal of tissue engineering and regenerative medicine 5(6): 464-475.

Angelats Lobo, D. and P. Ginestra (2019). "Cell Bioprinting: The 3D-Bioplotter™ Case." Materials 12(23): 4005.

Babensee, J. E., L. V. McIntire and A. G. Mikos (2000). "Growth factor delivery for tissue engineering." Pharmaceutical research 17(5): 497-504.

Badylak, S. F., M. Grompe, A. I. Caplan, H. P. Greisler, R. E. Guldberg and D. A. Taylor (2002). "In vivo remodeling." Annals of the New York academy of sciences 961(1): 319-322.

Bagheri, A. and J. Jin (2019). "Photopolymerization in 3D printing." ACS applied polymer materials 1(4): 593-611.

Balint, R., N. J. Cassidy and S. H. Cartmell (2012). "Electrical stimulation: a novel tool for tissue engineering." Tissue engineering part B: reviews 19(1): 48-57.

Bancroft, G. N., V. I. Sikavitsas, J. Van Den Dolder, T. L. Sheffield, C. G. Ambrose, J. A. Jansen and A. G. Mikos (2002). "Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner." Proceedings of the national academy of sciences 99(20): 12600-12605.

Banks, J. (2013). "Adding value in additive manufacturing: researchers in the United Kingdom and Europe look to 3D printing for customization." IEEE pulse 4(6): 22-26.

Bao, G., R. D. Kamm, W. Thomas, W. Hwang, D. A. Fletcher, A. J. Grodzinsky, C. Zhu and M. R. Mofrad (2010). "Molecular biomechanics: the molecular basis of how forces regulate cellular function." Cellular and molecular bioengineering 3(2): 91-105.

- Barash, Y., T. Dvir, P. Tandeitnik, E. Ruvinov, H. Guterman and S. Cohen (2010). "Electric field stimulation integrated into perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering." Tissue engineering part C: methods 16(6): 1417-1426.
- Barron, V., E. Lyons, C. Stenson-Cox, P. McHugh and A. Pandit (2003). "Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review." Annals of biomedical engineering 31(9): 1017-1030.
- Barrs, R. W., J. Jia, S. E. Silver, M. Yost and Y. Mei (2020). "Biomaterials for Bioprinting Microvasculature." Chemical Reviews 120(19): 10887-10949.
- Barszczewska-Rybarek, I., M. Gibas and M. Kurcok (2000). "Evaluation of the network parameter in aliphatic poly(urethane dimethacrylate)s by dynamic thermal analysis." Polymer 41(9): 3129-3135.
- Becker, T., B. Hitzmann, K. Muffler, R. Pörtner, K. F. Reardon, F. Stahl and R. Ulber (2007). "Future aspects of bioprocess monitoring." White biotechnology. Springer Verlag: 249-293.
- Berretta, S., K. E. Evans and O. Ghita (2015). "Processability of PEEK, a new polymer for high temperature laser sintering (HT-LS)." European polymer journal 68: 243-266.
- Billiet, T., M. Vandenhaute, J. Schelfhout, S. Van Vlierberghe and P. Dubruel (2012). "A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering." Biomaterials 33(26): 6020-6041.
- Bilodeau, K. and D. Mantovani (2006). "Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review." Tissue engineering 12(8): 2367-2383.
- Böhme, A., L. Radke, F. Schütze, S. Schneider, T. Liebscher, S. Sauer, L. Santo, F. Quadrini, M. Hummel and C. Giese (2017). "Miniaturized flow-through bioreactor for processing and testing in pharmacology." Materials science forum, Trans Tech Publications: 236-243.
- Bryers, J. D., C. M. Giachelli and B. D. Ratner (2012). "Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts." Biotechnology and bioengineering 109(8): 1898-1911.
- Burkhardt, F., C. G. Schirmeister, C. Wesemann, M. Nutini, S. Pieralli, E. H. Licht, M. Metzger, F. Wenz, R. Mülhaupt and B. C. Spies (2020). "Pandemic-Driven Development of a Medical-Grade, Economic and Decentralized Applicable Polyolefin Filament for Additive Fused Filament Fabrication." Molecules 25(24): 5929.
- Butler, D. L., S. A. Goldstein and F. Guilak (2000). "Functional tissue engineering: the role of biomechanics." Ann Arbor 1001(48109-0486): 77-78.
- Caulfield, B., P. E. McHugh and S. Lohfeld (2007). "Dependence of mechanical properties of polyamide components on build parameters in the SLS process." Journal of materials processing technology 182(1-3): 477-488.

- Cazón, A., P. Morer and L. Matey (2014). "PolyJet technology for product prototyping: Tensile strength and surface roughness properties." Proceedings of the institution of mechanical engineers, part B: Journal of engineering manufacture 228(12): 1664-1675.
- Chang, C.-H., H.-C. Liu, C.-C. Lin, C.-H. Chou and F.-H. Lin (2003). "Gelatin–chondroitin–hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering." Biomaterials 24(26): 4853-4858.
- Chen, H.-C. and Y.-C. Hu (2006). "Bioreactors for tissue engineering." Biotechnology letters 28(18): 1415-1423.
- Cohen, S., S. Magal, I. Yakov, E. Sirabella, A. Bitman, G. Groisman and C. Lotan (2018). "Tissue processing techniques for fabrication of covered stents for small-diameter vascular intervention." Acta biomaterialia 65: 248-258.
- Crump, S. S. (1992). "Apparatus and method for creating three-dimensional objects." U.S. Patent: US5121329.
- Culmone, C., G. Smit and P. Breedveld (2019). "Additive manufacturing of medical instruments: A state-of-the-art review." Additive Manufacturing 27: 461-473.
- Das, D. B. (2007). "Multiscale simulation of nutrient transport in hollow fibre membrane bioreactor for growing bone tissue: sub-cellular scale and beyond." Chemical engineering science 62(13): 3627-3639.
- Dawood, A., B. M. Marti, V. Sauret-Jackson and A. Darwood (2015). "3D printing in dentistry." British dental journal 219(11): 521.
- De Bartolo, L. (2015). "Hollow fiber membrane bioreactor for cell growth." Encyclopedia of membranes. Springer Verlag: 1-3.
- Deckard, C. R. (1989). "Method and apparatus for producing parts by selective sintering." U.S. Patent: US4863538.
- Dehghani, F. and N. Annabi (2011). "Engineering porous scaffolds using gas-based techniques." Current opinion in biotechnology 22(5): 661-666.
- Diegel, O., S. Singamneni, S. Reay and A. Withell (2010). "Tools for sustainable product design: additive manufacturing." Journal of sustainable development 3(3): 68-75.
- Diment, L. E., M. S. Thompson and J. H. Bergmann (2017). "Clinical efficacy and effectiveness of 3D printing: a systematic review." BMJ open 7(12): e016891.
- DIN EN ISO 10993-12 (2003). "Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil12: Probevorbereitung und Referenzmaterialien." Deutsches Institut für Normung e.V.
- DIN EN ISO 10993-5 (2003). "Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität." Deutsches Institut für Normung e.V.

Dojindo-Laboratories (2016). Cell counting kit-8 cell proliferation assay and cytotoxicity assay - technical manual.

Eurotransplant (2019). "Annual report 2019." 24.

Finger, W. J., K.-S. Lee and W. Podszun (1996). "Monomers with low oxygen inhibition as enamel/dentin adhesives." Dental materials 12(4): 256-261.

Fisher, J. P. (2013). Tissue engineering : principles and practices. Boca Raton, CRC Press: 8, 281-304, 425-456.

Freed, L. E., G. C. Engelmayr, J. T. Borenstein, F. T. Moutos and F. Guilak (2009). "Advanced material strategies for tissue engineering scaffolds." Advanced materials 21(32-33): 3410-3418.

Freed, L. E., F. Guilak, X. E. Guo, M. L. Gray, R. Tranquillo, J. W. Holmes, M. Radisic, M. V. Sefton, D. Kaplan and G. Vunjak-Novakovic (2006). "Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling." Tissue engineering 12(12): 3285-3305.

Freed, L. E. and G. Vunjak-Novakovic (1998). "Culture of organized cell communities." Advanced drug delivery reviews 33(1-2): 15-30.

Freed, L. E., G. Vunjak-Novakovic, R. J. Biron, D. B. Eagles, D. C. Lesnoy, S. K. Barlow and R. Langer (1994). "Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering." Nature biotechnology 12(7): 689.

Fridrikh, S. V., H. Y. Jian, M. P. Brenner and G. C. Rutledge (2003). "Controlling the fiber diameter during electrospinning." Physical review letters 90(14): 1-4.

Gaspar, D. A., V. Gomide and F. J. Monteiro (2012). "The role of perfusion bioreactors in bone tissue engineering." Biomatter 2(4): 167-175.

Gebhardt, A. (2012). "Understanding additive manufacturing." Carl Hanser Verlag: 4-5, 38-39.

Gensler, M., A. Leikeim, M. Möllmann, M. Komma, S. Heid, C. Müller, A. R. Boccaccini, S. Salehi, F. Groeber-Becker and J. Hansmann (2020). "3D printing of bioreactors in tissue engineering: A generalised approach." PloS one 15(11): e0242615.

Gibson, I., D. W. Rosen and B. Stucker (2010). "Additive manufacturing technologies." Springer Verlag: 1-6, 63-79.

Gospodarowicz, D. and J. S. Moran (1976). "Growth factors in mammalian cell culture." Annual review of biochemistry 45(1): 531-558.

Granet, C., N. Laroche, L. Vico, C. Alexandre and M. Lafage-Proust (1998). "Rotating-wall vessels, promising bioreactors for osteoblastic cell culture: comparison with other 3D conditions." Medical and biological engineering and computing 36(4): 513-519.

Gstraunthaler, G. and T. Lindl (2013). Zell-und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen, Springer Verlag: 69-86, 218-235.

- Guez, J., J. P. Cassar, F. Wartelle, P. Dhulster and H. Suhr (2004). "Real time in situ microscopy for animal cell-concentration monitoring during high density culture in bioreactor." Journal of biotechnology 111(3): 335-343.
- Guilak, F. (2002). "Functional tissue engineering." Annals of the New York academy of sciences 961(1): 193-195.
- Hamill, O. P. and B. Martinac (2001). "Molecular basis of mechanotransduction in living cells." Physiological reviews 81(2): 685-740.
- Hammond, T. and J. Hammond (2001). "Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel." American journal of physiology-renal physiology 281(1): 12-25.
- Han, X., N. Sharma, Z. Xu, L. Scheideler, J. Geis-Gerstorfer, F. Rupp, F. M. Thieringer and S. Spintzyk (2019). "An In Vitro Study of Osteoblast Response on Fused-Filament Fabrication 3D Printed PEEK for Dental and Cranio-Maxillofacial Implants." Journal of clinical medicine 8(6): 771.
- Hansmann, J., F. Groeber, A. Kahlig, C. Kleinhans and H. Walles (2013). "Bioreactors in tissue engineering—principles, applications and commercial constraints." Biotechnology journal 8(3): 298-307.
- Helinski, R. (1992). "Method and means for constructing three-dimensional articles by particle deposition." U.S. Patent: US5136515.
- Holy, C. E., M. S. Shoichet and J. E. Davies (2000). "Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period." Journal of biomedical materials research 51(3): 376-382.
- Honigmann, P., N. Sharma, B. Okolo, U. Popp, B. Msallem and F. M. Thieringer (2018). "Patient-specific surgical implants made of 3D printed PEEK: material, technology, and scope of surgical application." BioMed research international 2018.
- Hronik-Tupaj, M. and D. L. Kaplan (2012). "A review of the responses of two-and three-dimensional engineered tissues to electric fields." Tissue engineering part B: reviews 18(3): 167-180.
- Huang, Y., M. C. Leu, J. Mazumder and A. Donmez (2015). "Additive manufacturing: current state, future potential, gaps and needs, and recommendations." Journal of Manufacturing Science and Engineering 137(1): 014001.
- Hull, C. W. (1986). "Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography." U.S. Patent: US4575330.
- Iyer, R. K., L. L. Chiu, L. A. Reis and M. Radisic (2011). "Engineered cardiac tissues." Current opinion in biotechnology 22(5): 706-714.

- Janvier, A. J., E. Canty-Laird and J. R. Henstock (2020). "A universal multi-platform 3D printed bioreactor chamber for tendon tissue engineering." Journal of Tissue Engineering 11: 2041731420942462.
- Javaid, M. and A. Haleem (2018). "Additive manufacturing applications in medical cases: A literature based review." Alexandria Journal of Medicine 54(4): 411-422.
- Jeevarajan, A. S., S. Vani, T. D. Taylor and M. M. Anderson (2002). "Continuous pH monitoring in a perfused bioreactor system using an optical pH sensor." Biotechnology and bioengineering 78(4): 467-472.
- Jirsova, K., J. Clover, C. G. Stoeger and W. J. Armitage (2017). "Light and specular microscopy assessment of the cornea for grafting." Light and specular microscopy of the cornea. Springer: 75-99.
- Kami, D., K. Watakabe, M. Yamazaki-Inoue, K. Minami, T. Kitani, Y. Itakura, M. Toyoda, T. Sakurai, A. Umezawa and S. Gojo (2013). "Large-scale cell production of stem cells for clinical application using the automated cell processing machine." BMC biotechnology 13(1): 102.
- Kang, H.-W., S. J. Lee, I. K. Ko, C. Kengla, J. J. Yoo and A. Atala (2016). "A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity." Nature biotechnology 34(3): 312-319.
- Khalili, A. A. and M. R. Ahmad (2015). "A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications." International journal of molecular sciences 16(8): 18149-18184.
- King, J. A. and W. M. Miller (2007). "Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation." Current opinion in chemical biology 11(4): 394-398.
- Kowsari, K., B. Zhang, S. Panjwani, Z. Chen, H. Hingorani, S. Akbari, N. X. Fang and Q. Ge (2018). "Photopolymer formulation to minimize feature size, surface roughness, and stair-stepping in digital light processing-based three-dimensional printing." Additive manufacturing 24: 627-638.
- Kurzmann, C., K. Janjić, H. Shokoohi-Tabrizi, M. Edelmayer, M. Pensch, A. Moritz and H. Agis (2017). "Evaluation of resins for stereolithographic 3D-printed surgical guides: the response of L929 cells and human gingival fibroblasts." BioMed research international 2017: 1-11.
- Lamparter, J. and E. Hoffmann (2009). "Messung des Augeninnendruckes (Tonometrie) mit unterschiedlichen Verfahren." Der Ophthalmologe 106(8): 676-682.
- Langer, R. and J. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science 260(5110): 920-926.
- Lanza, R., R. Langer and J. P. Vacanti (2014). Principles of tissue engineering, Academic press: 3-8, 9-24, 261-278.

- Lee, K., E. A. Silva and D. J. Mooney (2011). "Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments." Journal of the royal society interface 8(55): 153-170.
- Lehoux, S., Y. Castier and A. Tedgui (2006). "Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces." Journal of internal medicine 259(4): 381-392.
- Li, Y., T. Ma, D. A. Kniss, L. C. Lasky and S. T. Yang (2001). "Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices." Biotechnology progress 17(5): 935-944.
- Ligon, S. C., R. Liska, J. Stampfl, M. Gurr and R. Mülhaupt (2017). "Polymers for 3D printing and customized additive manufacturing." 10212-10290.
- Lin, W., J. Zhang, Z. Wang and S. Chen (2011). "Development of robust biocompatible silicone with high resistance to protein adsorption and bacterial adhesion." Acta biomaterialia 7(5): 2053-2059.
- Lindstrom, R. L., H. E. Kaufman, D. L. Skelnik, R. A. Laing, J. H. Lass, D. C. Musch, M. D. Trousdale, W. J. Reinhart, T. E. Burris and A. Sugar (1992). "Optisol corneal storage medium." American journal of ophthalmology 114(3): 345-356.
- Lipson, H. (2013). "New world of 3-D printing offers" completely new ways of thinking": Q&A with author, engineer, and 3-D printing expert Hod Lipson." IEEE pulse 4(6): 12-14.
- Lopes, A. G. (2015). "Single-use in the biopharmaceutical industry: A review of current technology impact, challenges and limitations." Food and bioproducts processing 93: 98-114.
- Macdonald, N. P., F. Zhu, C. Hall, J. Reboud, P. Crosier, E. Patton, D. Wlodkowic and J. Cooper (2016). "Assessment of biocompatibility of 3D printed photopolymers using zebrafish embryo toxicity assays." Lab on a chip 16(2): 291-297.
- Maiorano, G., S. Sabella, B. Sorce, V. Brunetti, M. A. Malvindi, R. Cingolani and P. P. Pompa (2010). "Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein– nanoparticle complexes and influence on the cellular response." ACS nano 4(12): 7481-7491.
- Markx, G. H. (2008). "The use of electric fields in tissue engineering: A review." Organogenesis 4(1): 11-17.
- Martin, I., D. Wendt and M. Heberer (2004). "The role of bioreactors in tissue engineering." TRENDS in Biotechnology 22(2): 80-86.
- Martin, Y. and P. Vermette (2005). "Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances." Biomaterials 26(35): 7481-7503.
- Maschhoff, P., S. Heene, A. Lavrentieva, T. Hentrop, C. Leibold, M. N. Wahalla, N. Stanislawski, H. Blume, T. Scheper and C. Blume (2017). "An intelligent bioreactor system for the cultivation of a bioartificial vascular graft." Engineering in life sciences 17(5): 567-578.

Mauck, R. L., S. L. Seyhan, G. A. Ateshian and C. T. Hung (2002). "Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocyte-seeded agarose hydrogels." Annals of biomedical engineering 30(8): 1046-1056.

Mauck, R. L., M. A. Soltz, C. C. Wang, D. D. Wong, P.-H. G. Chao, W. B. Valhmu, C. T. Hung and G. A. Ateshian (2000). "Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels." Journal of biomechanical engineering 122(3): 252-260.

Maxson, S., D. Orr and K. J. L. Burg (2011). "Bioreactors for tissue engineering." Tissue engineering: From lab to clinic. Springer Berlin Heidelberg: 179-197.

Melchels, F. P., A. M. Barradas, C. A. Van Blitterswijk, J. De Boer, J. Feijen and D. W. Grijpma (2010). "Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing." Acta biomaterialia 6(11): 4208-4217.

Melchels, F. P., M. A. Domingos, T. J. Klein, J. Malda, P. J. Bartolo and D. W. Hutmacher (2012). "Additive manufacturing of tissues and organs." Progress in polymer science 37(8): 1079-1104.

Melchels, F. P., B. Tonnarelli, A. L. Olivares, I. Martin, D. Lacroix, J. Feijen, D. J. Wendt and D. W. Grijpma (2011). "The influence of the scaffold design on the distribution of adhering cells after perfusion cell seeding." Biomaterials 32(11): 2878-2884.

Mellor, S., L. Hao and D. Zhang (2014). "Additive manufacturing: A framework for implementation." International journal of production economics 149: 194-201.

Monzón, M., Z. Ortega, A. Hernández, R. Paz and F. Ortega (2017). "Anisotropy of photopolymer parts made by digital light processing." Materials 10(1): 64.

Monzón, M., Z. Ortega, A. Martínez and F. Ortega (2015). "Standardization in additive manufacturing: activities carried out by international organizations and projects." The international journal of advanced manufacturing technology 76(5-8): 1111-1121.

Muschler, G. F., C. Nakamoto and L. G. Griffith (2004). "Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering." JBJS 86(7): 1541-1558.

Ngan, C., C. O'Connell, R. Blanchard, M. Boyd-Moss, R. J. Williams, J. Bourke, A. Quigley, P. McKelvie, R. Kapsa and P. Choong (2019). "Optimising the biocompatibility of 3D printed photopolymer constructs in vitro and In Vivo." Biomedical materials 14(3): 1-33.

Nguyen, D., D. A. Hägg, A. Forsman, J. Ekholm, P. Nimkingratana, C. Brantsing, T. Kalogeropoulos, S. Zaunz, S. Concaro and M. Brittberg (2017). "Cartilage tissue engineering by the 3D bioprinting of iPS cells in a nanocellulose/alginate bioink." Scientific reports 7(1): 1-10.

Nichols, D. A., I. S. Sondh, S. R. Litte, P. Zunino and R. Gottardi (2018). "Design and validation of an osteochondral bioreactor for the screening of treatments for osteoarthritis." Biomedical microdevices 20(1): 1-8.

Nishi, C., N. Nakajima and Y. Ikada (1995). "In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification." Journal of biomedical materials research part A 29(7): 829-834.

Obradovic, B., R. L. Carrier, G. Vunjak-Novakovic and L. E. Freed (1999). "Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage." Biotechnology and bioengineering 63(2): 197-205.

Ogliari, F. A., C. Ely, C. H. Zanchi, C. B. Fortes, S. M. Samuel, F. F. Demarco, C. L. Petzhold and E. Piva (2008). "Influence of chain extender length of aromatic dimethacrylates on polymer network development." Dental materials 24(2): 165-171.

Pei, M., L. A. Solchaga, J. Seidel, L. Zeng, G. Vunjak-Novakovic, A. I. Caplan and L. E. Freed (2002). "Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds." The FASEB journal 16(12): 1691-1694.

Piironen, K., M. Haapala, V. Talman, P. Järvinen and T. Sikanen (2020). "Cell adhesion and proliferation on common 3D printing materials used in stereolithography of microfluidic devices." Lab on a Chip 20(13): 2372-2382.

Pörtner, R., S. Nagel-Heyer, C. Goepfert, P. Adamietz and N. M. Meenen (2005). "Bioreactor design for tissue engineering." Journal of bioscience and bioengineering 100(3): 235-245.

Putame, G., M. Terzini, D. Carbonaro, G. Pisani, G. Serino, F. Di Meglio, C. Castaldo and D. Massai (2019). "Application of 3D printing technology for design and manufacturing of customized components for a mechanical stretching bioreactor." Journal of healthcare engineering 2019.

Radisic, M., A. Marsano, R. Maidhof, Y. Wang and G. Vunjak-Novakovic (2008). "Cardiac tissue engineering using perfusion bioreactor systems." Nature protocols 3(4): 719-738.

Raveling, A. R., S. K. Theodossiou and N. R. Schiele (2018). "A 3D printed mechanical bioreactor for investigating mechanobiology and soft tissue mechanics." MethodsX 5: 924-932.

Regehly, M., Y. Garmshausen, M. Reuter, N. F. König, E. Israel, D. P. Kelly, C.-Y. Chou, K. Koch, B. Asfari and S. Hecht (2020). "Xolography for linear volumetric 3D printing." Nature 588(7839): 620-624.

Resnikoff, S., D. Pascolini, D. Etya'Ale, I. Kocur, R. Pararajasegaram, G. P. Pokharel and S. P. Mariotti (2004). "Global data on visual impairment in the year 2002." Bulletin of the world health organization 82: 844-851.

Riddle, R. C. and H. J. Donahue (2009). "From streaming-potentials to shear stress: 25 years of bone cell mechanotransduction." Journal of orthopaedic research 27(2): 143-149.

- Roberts, I., S. Baila, R. B. Rice, M. E. Janssens, K. Nguyen, N. Moens, L. Ruban, D. Hernandez, P. Coffey and C. Mason (2012). "Scale-up of human embryonic stem cell culture using a hollow fibre bioreactor." Biotechnology letters 34(12): 2307-2315.
- Röck, T., J. Hofmann, S. Thaler, M. Bramkamp, K. Bartz-Schmidt, E. Yoeruek and D. Röck (2016). "Factors that influence the suitability of human organ-cultured corneas." Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology 254(1): 135-141.
- Ross, R., E. W. Raines and D. F. Bowen-Pope (1986). "The biology of platelet-derived growth factor." Cell 46(2): 155-169.
- Rueggeberg, F. and D. Margeson (1990). "The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite system." Journal of dental research 69(10): 1652-1658.
- Sachs, E. M., J. S. Haggerty, M. J. Cima and P. A. Williams (1993). "Three-dimensional printing techniques." U.S. Patent: US5204055.
- Sagita, I. D., Y. Whulanza, R. Dhelika and I. Nurhadi (2018). "Designing electrical stimulated bioreactors for nerve tissue engineering." AIP conference proceedings, AIP Publishing: 1-6.
- Sahoo, S., L. T. Ang, J. C. H. Goh and S. L. Toh (2010). "Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications." Journal of biomedical materials research part A 93(4): 1539-1550.
- Salehi-Nik, N., G. Amoabediny, B. Pouran, H. Tabesh, M. A. Shokrgozar, N. Haghighipour, N. Khatibi, F. Anisi, K. Mottaghy and B. Zandieh-Doulabi (2013). "Engineering parameters in bioreactor's design: a critical aspect in tissue engineering." BioMed research international: 1-15.
- Schenk, R. (1986). "Bone response to grafts and implants." Perspectives on biomaterials, materials science monographs 33: 121-136.
- Schirmeister, C. G., T. Hees, E. H. Licht and R. Muelhaupt (2019). "3D printing of high density polyethylene by fused filament fabrication." Additive Manufacturing 28: 152-159.
- Schmelzer, E., P. Over, B. Gridelli and J. C. Gerlach (2016). "Response of primary human bone marrow mesenchymal stromal cells and dermal keratinocytes to thermal printer materials in vitro." Journal of medical and biological engineering 36(2): 153-167.
- Schmid, R., I. S. Tarau, A. Rossi, S. Leonhardt, T. Schwarz, S. Schuerlein, C. Lotz and J. Hansmann (2018). "In vivo-like culture conditions in a bioreactor facilitate improved tissue quality in corneal storage." Biotechnology journal 13(1): 1700344.
- Schuerlein, S., T. Schwarz, S. Krzimirski, S. Gätzner, A. Hoppensack, I. Schwedhelm, M. Schweinlin, H. Walles and J. Hansmann (2017). "A versatile modular bioreactor platform for tissue engineering." Biotechnology journal 12(2): 1-11.

- Schwarz, R. P., T. J. Goodwin and D. A. Wolf (1992). "Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity." Journal of tissue culture methods 14(2): 51-57.
- Serena, E., E. Figallo, N. Tandon, C. Cannizzaro, S. Gerecht, N. Elvassore and G. Vunjak-Novakovic (2009). "Electrical stimulation of human embryonic stem cells: cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species." Experimental cell research 315(20): 3611-3619.
- Shaffer, S., K. Yang, J. Vargas, M. A. Di Prima and W. Voit (2014). "On reducing anisotropy in 3D printed polymers via ionizing radiation." Polymer 55(23): 5969-5979.
- Sharma, N., S. Aghlmandi, S. Cao, C. Kunz, P. Honigmann and F. M. Thieringer (2020). "Quality Characteristics and Clinical Relevance of In-House 3D-Printed Customized Polyetheretherketone (PEEK) Implants for Craniofacial Reconstruction." Journal of Clinical Medicine 9(9): 2818.
- Sharma, N., P. Honigmann, S. Cao and F. Thieringer (2020). "Dimensional characteristics of FDM 3D printed PEEK implant for craniofacial reconstructions." Transactions on Additive Manufacturing Meets Medicine 2(1).
- Shawkat, E. S., A. C. Shortall, O. Addison and W. M. Palin (2009). "Oxygen inhibition and incremental layer bond strengths of resin composites." Dental materials 25(11): 1338-1346.
- Shen, N., J. A. Riedl, D. A. C. Berrio, Z. Davis, M. G. Monaghan, S. L. Layland, S. Hinderer and K. Schenke-Layland (2018). "A flow bioreactor system compatible with real-time two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy." Biomedical materials 13(2): 1-10.
- Shukla, A. A. and U. Gottschalk (2013). "Single-use disposable technologies for biopharmaceutical manufacturing." Trends in biotechnology 31(3): 147-154.
- Shvartsman, I., T. Dvir, T. Harel-Adar and S. Cohen (2008). "Perfusion cell seeding and cultivation induce the assembly of thick and functional hepatocellular tissue-like construct." Tissue engineering part A 15(4): 751-760.
- Sikavitsas, V. I., G. N. Bancroft, H. L. Holtorf, J. A. Jansen and A. G. Mikos (2003). "Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces." Proceedings of the national academy of sciences 100(25): 14683-14688.
- Sikavitsas, V. I., G. N. Bancroft and A. G. Mikos (2002). "Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor." Journal of biomedical materials research part A 62(1): 136-148.
- Smith, L. J., P. Li, M. R. Holland and B. Ekser (2018). "FABRICA: a bioreactor platform for printing, perfusing, observing, & stimulating 3D tissues." Scientific reports 8(1): 1-10.
- Srivatsan, T. and T. Sudarshan (2015). "Additive manufacturing: innovations, advances, and applications." CRC Press: 1-6.

Stoltz, J., D. Dumas, X. Wang, E. Payan, D. Mainard, F. Paulus, G. Maurice, P. Netter and S. Muller (2000). "Influence of mechanical forces on cells and tissues." Biorheology 37(1-2): 3-14.

Stratasys (2014). "M30i - datasheet."

Sucosky, P., D. F. Osorio, J. B. Brown and G. P. Neitzel (2004). "Fluid mechanics of a spinner-flask bioreactor." Biotechnology and bioengineering 85(1): 34-46.

Sun, C., N. Fang, D. Wu and X. Zhang (2005). "Projection micro-stereolithography using digital micro-mirror dynamic mask." Sensors and actuators A: physical 121(1): 113-120.

Sweigart, M. and K. Athanasiou (2005). "Tensile and compressive properties of the medial rabbit meniscus." Proceedings of the institution of mechanical engineers, part H: journal of engineering in medicine 219(5): 337-347.

Tandon, N., C. Cannizzaro, P.-H. G. Chao, R. Maidhof, A. Marsano, H. T. H. Au, M. Radisic and G. Vunjak-Novakovic (2009). "Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering." Nature protocols 4(2): 155-173.

Tandon, N., A. Marsano, R. Maidhof, K. Numata, C. Montouri-Sorrentino, C. Cannizzaro, J. Voldman and G. Vunjak-Novakovic (2010). "Surface-patterned electrode bioreactor for electrical stimulation." Lab on a chip 10(6): 692-700.

Tellisi, N., N. A. Ashammakhi, F. Billi and O. Kaarela (2018). "Three dimensional printed bone implants in the clinic." Journal of Craniofacial Surgery 29(8): 2363-2367.

Timmins, N. E., A. Scherberich, J.-A. Früh, M. Heberer, I. Martin and M. Jakob (2007). "Three-dimensional cell culture and tissue engineering in a T-CUP (tissue culture under perfusion)." Tissue engineering 13(8): 2021-2028.

Trepat, X., L. Deng, S. S. An, D. Navajas, D. J. Tschumperlin, W. T. Gerthoffer, J. P. Butler and J. J. Fredberg (2007). "Universal physical responses to stretch in the living cell." Nature 447(7144): 592-596.

Tuomi, J., K.-S. Paloheimo, J. Vehviläinen, R. Björkstrand, M. Salmi, E. Huottilainen, R. Kontio, S. Rouse, I. Gibson and A. A. Mäkitie (2014). "A novel classification and online platform for planning and documentation of medical applications of additive manufacturing." Surgical innovation 21(6): 553-559.

Ulber, R., J.-G. Frerichs and S. Beutel (2003). "Optical sensor systems for bioprocess monitoring." Analytical and bioanalytical chemistry 376(3): 342-348.

Usuludin, S. B. M., X. Cao and M. Lim (2012). "Co-culture of stromal and erythroleukemia cells in a perfused hollow fiber bioreactor system as an in vitro bone marrow model for myeloid leukemia." Biotechnology and bioengineering 109(5): 1248-1258.

Vaezi, M., C. Black, D. M. Gibbs, R. O. Oreffo, M. Brady, M. Moshrefi-Torbati and S. Yang (2016). "Characterization of new PEEK/HA composites with 3D HA network fabricated by extrusion freeforming." Molecules 21(6): 687.

Vaezi, M., S. Chianrabutra, B. Mellor and S. Yang (2013). "Multiple material additive manufacturing—part 1: a review: this review paper covers a decade of research on multiple material additive manufacturing technologies which can produce complex geometry parts with different materials." Virtual and physical prototyping 8(1): 19-50.

Van Blitterswijk, C. and J. De Boer (2014). "Tissue engineering." Elsevier Science: 1-7, 393-396, 398-400, 404-417.

Van der Valk, J., D. Brunner, K. De Smet, Å. F. Svenningsen, P. Honegger, L. E. Knudsen, T. Lindl, J. Noraberg, A. Price and M. Scarino (2010). "Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods." Toxicology in vitro 24(4): 1053-1063.

Van Noort, R. (2012). "The future of dental devices is digital." Dental materials 28(1): 3-12.

Ventola, C. L. (2014). "Medical applications for 3D printing: current and projected uses." Pharmacy and therapeutics 39(10): 704-711.

Vunjak-Novakovic, G., I. Martin, B. Obradovic, S. Treppo, A. Grodzinsky, R. Langer and L. Freed (1999). "Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage." Journal of Orthopaedic Research 17(1): 130-138.

Wallin, R. F. and E. Arscott (1998). "A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity." Medical device and diagnostic industry 20: 96-98.

Walraven, J. A. (2003). "Future challenges for MEMS failure analysis." ITC international test conference, IEEE: 850-855.

Wang, Y.-X., J. L. Robertson, W. B. Spillman and R. O. Claus (2004). "Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility." Pharmaceutical research 21(8): 1362-1373.

Wendt, D., A. Marsano, M. Jakob, M. Heberer and I. Martin (2003). "Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity." Biotechnology and bioengineering 84(2): 205-214.

Wendt, D., S. Riboldi, M. Cioffi and I. Martin (2008). "Bioreactors in tissue engineering: scientific challenges and clinical perspectives." Advances in biochemical engineering / biotechnology: 1-27.

Wendt, D., S. A. Riboldi, M. Cioffi and I. Martin (2009). "Potential and bottlenecks of bioreactors in 3D cell culture and tissue manufacturing." Advanced materials 21(32-33): 3352-3367.

- Williams, D. F. (2008). "On the mechanisms of biocompatibility." Biomaterials 29(20): 2941-2953.
- Wintermantel, E. and S.-W. Ha (2008). Medizintechnik: life science engineering, Springer-Verlag: 67-72, 79-90.
- Wolff, C., S. Beutel and T. Scheper (2013). "Tubular membrane bioreactors for biotechnological processes." Applied microbiology and biotechnology 97(3): 929-937.
- Wung, N., S. M. Acott, D. Tosh and M. J. Ellis (2014). "Hollow fibre membrane bioreactors for tissue engineering applications." Biotechnology letters 36(12): 2357-2366.
- Xu, Y., Q. Wang, Y. Li, Y. Gan, P. Li, S. Li, Y. Zhou and Q. Zhou (2015). "Cyclic tensile strain induces tenogenic differentiation of tendon-derived stem cells in bioreactor culture." BioMed research international: 1-14.
- Yano, S., M. Komine, M. Fujimoto, H. Okochi and K. Tamaki (2004). "Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes." Journal of investigative dermatology 122(3): 783-790.
- Yeatts, A. B. and J. P. Fisher (2011). "Bone tissue engineering bioreactors: dynamic culture and the influence of shear stress." Bone 48(2): 171-181.
- Zeng, Y., Y. Yan, H. Yan, C. Liu, P. Li, P. Dong, Y. Zhao and J. Chen (2018). "3D printing of hydroxyapatite scaffolds with good mechanical and biocompatible properties by digital light processing." Journal of materials science 53(9): 6291-6301.
- Zhao, F., R. Chella and T. Ma (2007). "Effects of shear stress on 3-D human mesenchymal stem cell construct development in a perfusion bioreactor system: experiments and hydrodynamic modeling." Biotechnology and bioengineering 96(3): 584-595.
- Zhao, F. and T. Ma (2005). "Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: dynamic cell seeding and construct development." Biotechnology and bioengineering 91(4): 482-493.
- Zhu, C., G. Bao and N. Wang (2000). "Cell mechanics: mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation." Annual review of biomedical engineering 2(1): 189-226.
- Zhu, F., T. Friedrich, D. Nugegoda, J. Kaslin and D. Wlodkovic (2015). "Assessment of the biocompatibility of three-dimensional-printed polymers using multispecies toxicity tests." Biomicrofluidics 9(6): 1-6.

Anhang

A Massenspektren der HPLC-MS Messungen

Im Folgenden sind alle erhaltenen Massenspektren (vgl. Kapitel 6.2) aufgeführt sowie detailliert beschrieben.

A1: Massenspektren von reinem deionisiertem Wasser und reinem Ethanol

Die Messung dieser Massenspektren dient zur Gewinnung von Referenzspektren für deionisiertes Wasser, reines Ethanol sowie Verunreinigungen der Chromatographie-Säule. So sollen diese beim Vergleich mit den Massenspektren der Eluate aus gedruckten Probekörper des Acrylat-basierten Photopolymers erkannt werden. Abbildung 69 zeigt die Retentionszeit der detektierten Substanzen gegenüber der Intensität.

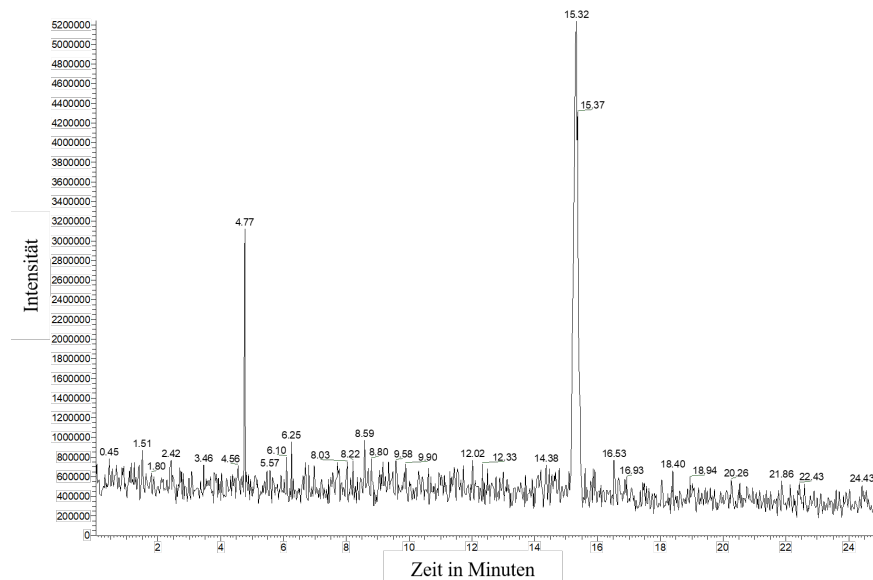


Abbildung 69: Intensität detektierter Substanzen reines deionierten Wassers über die Retentionszeiten.

Im Massenspektrum kann ein Peak bei Minute 4,77 sowie eine Bande zu Minute 15,3 detektiert werden. Die genauen Massenzahlen der detektierten Substanzen im Retentionszeitraum von 4,01 bis 5,21 Minuten können in Abbildung 70 gesehen werden. Die Massenzahl von reinem Wasser beträgt 18, welche jedoch nicht im Massenspektrum gesehen werden kann. Es können vor allem Substanzen mit den Massenzahlen 166,71, 207,61, 275,61, 296,57, 364,49, 391,48, und 487,54 gemessen werden. Diesen Massenzahlen werden somit Verschmutzungen innerhalb der Chromatographie-Säule zugewiesen. Für die Auswertung und Interpretation der folgenden Ergebnisse werden diese Massenzahlen daher nicht weiter berücksichtigt.

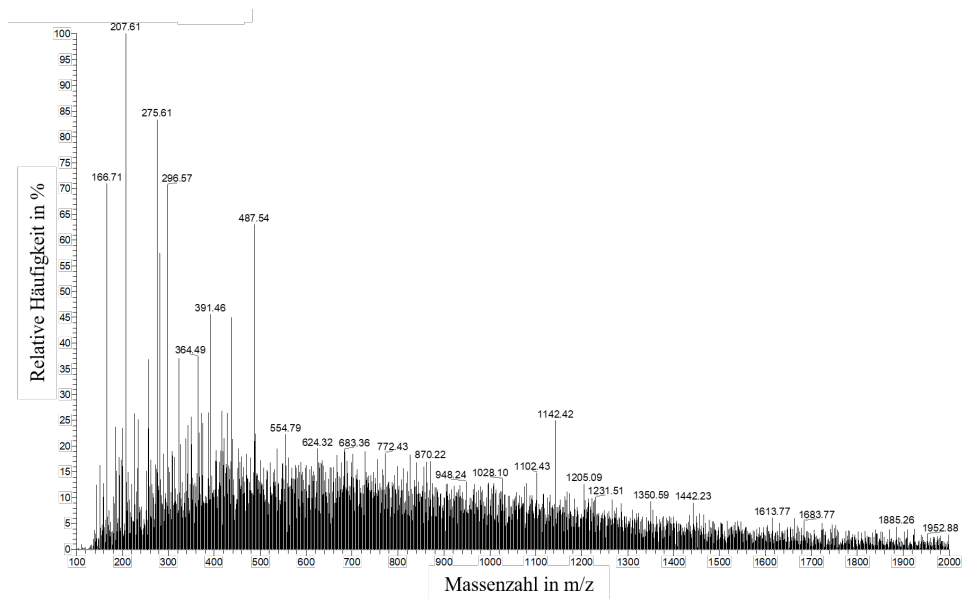


Abbildung 70: Massenzahlen detektiertes Substanzen in reinem deionisiertem Wasser im Retentionszeitraum von 4,01 bis 5,21 Minuten.

Abbildung 71 zeigt die Retentionszeiten detektiertes Substanzen in reinem Ethanol gegenüber der Intensität.

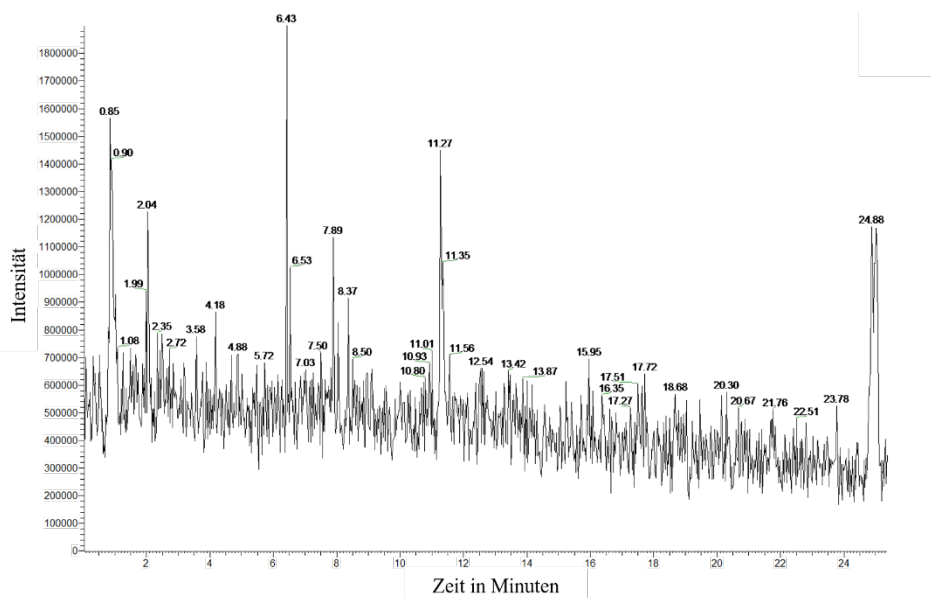


Abbildung 71: Intensität detektiertes Substanzen des reinen Ethanols gegenüber Retentionszeiten: Es können viele Peaks mit insgesamt jedoch geringer Intensität detektiert werden.

Im Folgenden wird exemplarisch auf das Massenspektrum des Retentionszeitraums von 0,3 bis 2,98 Minuten eingegangen (vgl. Abbildung 72). Ethanol besitzt eine molare Masse von 46. Es können vor allem Substanzen mit den Massenzahlen 166,71, 207,64, 275,63, 296,54, 364,4,

437,58 und 487,55 gemessen werden. Wie bei dem Massenspektrum der Messung mit reinem deionisiertem Wasser wird angenommen, dass es sich hierbei um Verschmutzungen sowie Rückstände in der Chromatographie-Säule handelt. Für die Auswertung und Interpretation der folgenden Ergebnisse werden diese Massenzahlen ebenso nicht berücksichtigt.

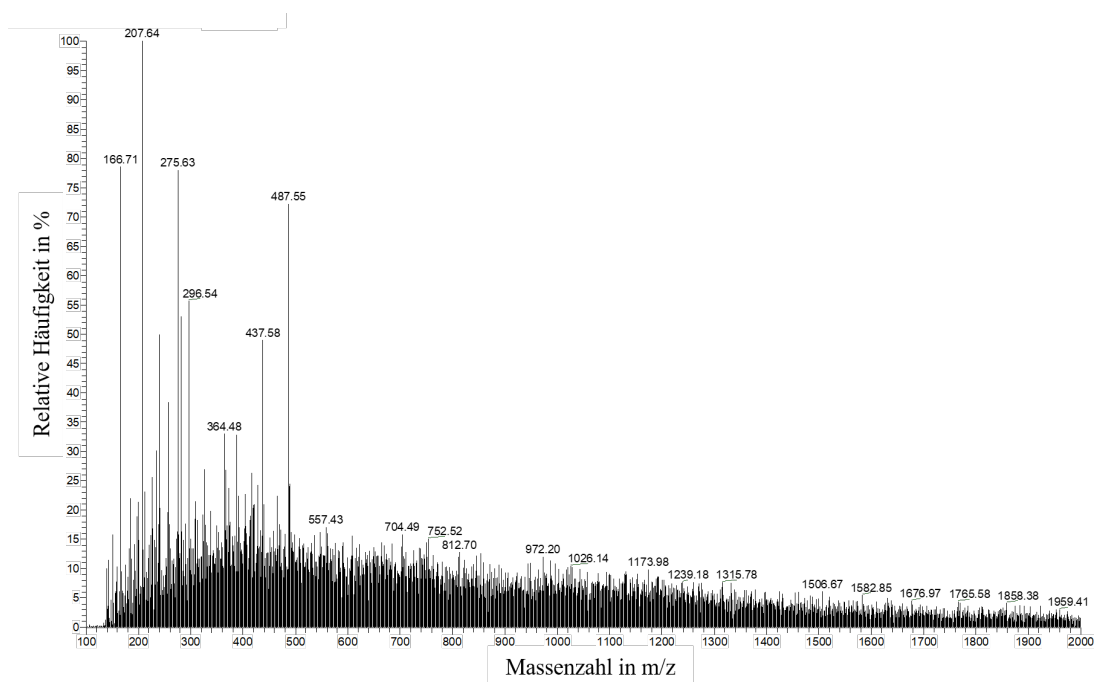


Abbildung 72: Massenzahlen detektierter Substanzen in reinem Ethanol im Retentionszeitraum von 0,3 bis 2,98 Minuten.

A2: Massenspektren des reinen Monomers

Die Messung dieses Massenspektrums dient zur Erzeugung eines Referenzspektrums für die reinen Monomere des Acrylat-basierten Photopolymers, um diese bei dem späteren Vergleich mit dem Massenspektrum der Eluate gedruckter Probekörper eindeutig identifizieren zu können. Abbildung 73 zeigt die Retentionszeit detektierter Substanzen der reinen Monomere des Acrylat-basierten Photopolymers gegenüber der Intensität. Nach einer Retentionszeit von ca. 8 Minuten ist ein erster schwacher Peak zu erkennen. Nach einer Retentionszeit von ca. 12 Minuten ist eine Bande mit mehreren Peaks niedriger Intensität zu beobachten. Die intensivste Bande beginnt nach einer Retentionszeit von ca. 16 Minuten.

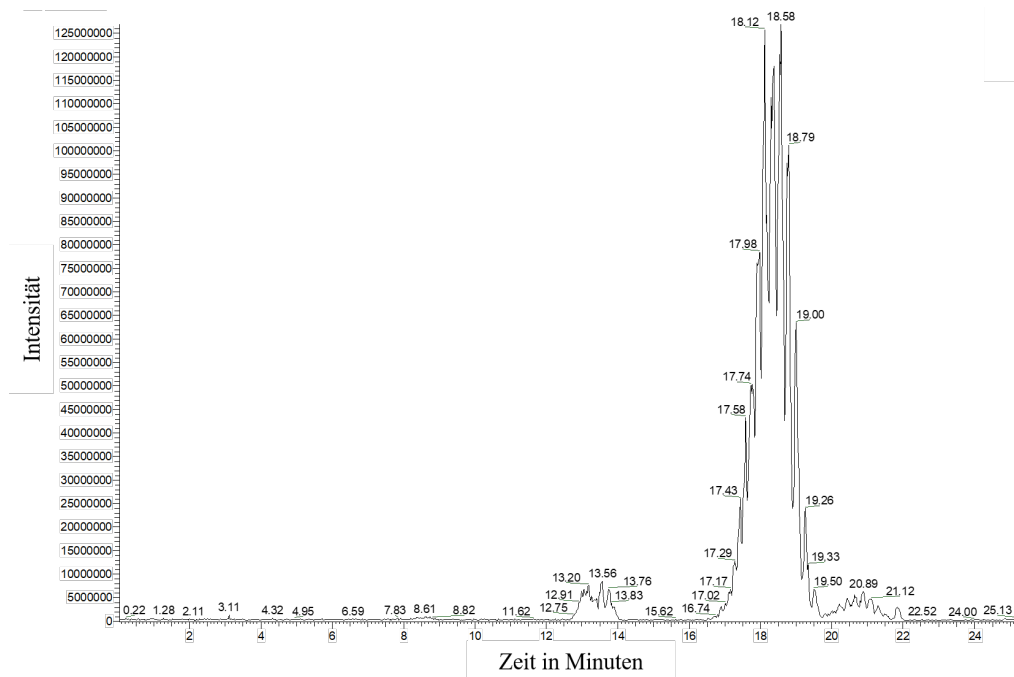


Abbildung 73: Massenspektrum der reinen Monomere des Acrylat-basierten Photopolymers.

Im Rahmen dieser Arbeit wird exemplarisch auf das Massenspektrum des ersten Peaks sowie des intensivsten Peaks im Detail eingegangen. Abbildung 74 zeigt das Massenspektrum des Retentionszeitraum von Minute 8,23 bis 8,88.

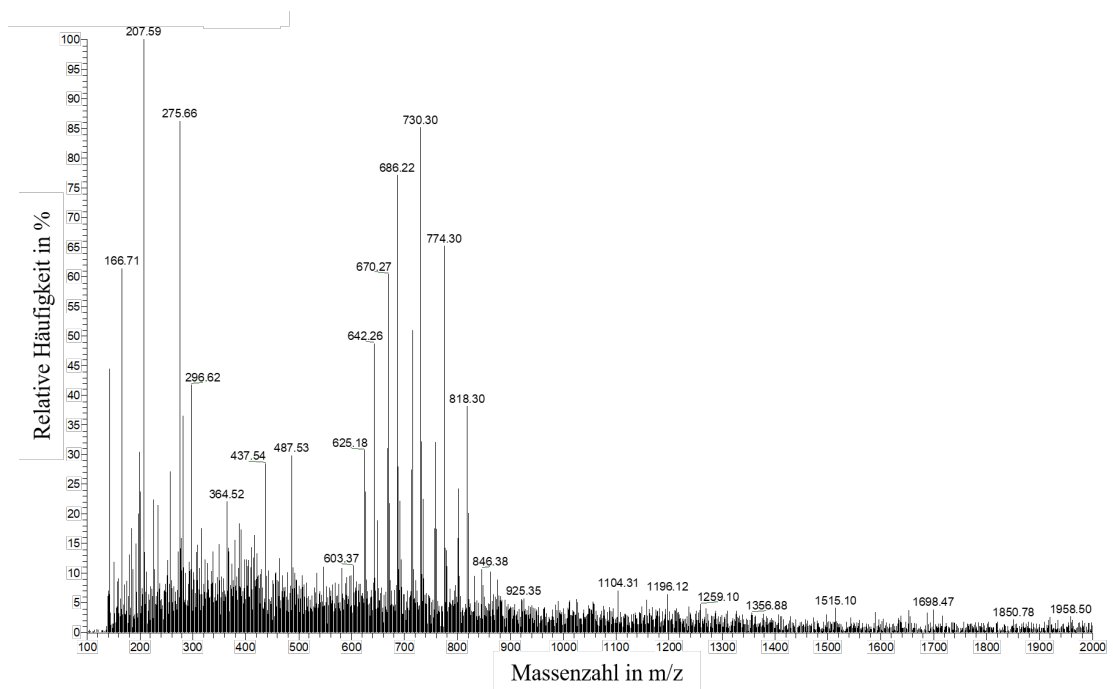


Abbildung 74: Massenzahlen detektierter Substanzen der reinen Monomere im Retentionszeitraum 8,23 bis 8,88 Minuten.

Während der Retentionszeit von 8,23 Minuten bis 8,88 Minuten können bereits nachgewiesene Verunreinigungen mit den Massenzahlen 166,71, 207,59, 275,66, 296,62, 364,52, 437,54 und 487,53 detektiert werden. Diese wurden in den Referenzmessungen mit reinem Wasser sowie reinem Ethanol Verunreinigungen zugeordnet, weshalb sie im Rahmen dieser Untersuchung nicht weiter beachtet werden.

Weiterhin werden Massenzahlen von 642,3, 686,2, 730,3, 774,3 und 818,3 gemessen. Zwischen diesen liegt jeweils genau die Massendifferenz von 44. Dies entspricht exakt der molaren Masse von Ethylenoxid, welches zur Ethoxylierung der Monomere verwendet wird.

Bei der Herstellung von Bisphenol-A-Dimethacrylat erfolgt zunächst eine Ethoxylierung von Bisphenol-A (BisA, molare Masse: 228 g/mol) welches anschließend weiter zu Bisphenol-A-Dimethacrylat (BisDMA, molare Masse: 364 g/mol) synthetisiert wird. Bei der Synthese werden häufig Ammoniumionen (NH₄) verwendet. Diese besitzen eine molare Masse von 18 g/mol und können mittels der HPLC-MS Analyse detektiert werden. Zusätzlich kann es auch zu Anbindung von Protonen kommen, die ebenfalls im Massenspektrum detektierbar sind. Bei Kontakt mit wässrigem Medium können die Esterbindungen des BisDMA angegriffen werden und eine Rückreaktion zu BisA erfolgen. Die detektierten Massezahlen der Retentionszeit von 8,23 bis 8,88 Minuten sind somit ethoxylierten Bisphenol-A Molekülen mit einem anhaftenden Ammoniumion zuzuordnen (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17: Zuordnung der Massenzahlen der Retentionszeit von 8,2 bis 8,9 Minuten.

Massenzahl	Grundsubstanz	Ethoxylierungsgrad	Zusatzsubstanz
642,3	BisA (228,3 g/mol)	9 x EO (396 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
686,2	BisA (228,3 g/mol)	10 x EO (440 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
730,3	BisA (228,3 g/mol)	11 x EO (484 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
774,3	BisA (228,3 g/mol)	12 x EO (528 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
818,3	BisA (228,3 g/mol)	13 x EO (572 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)

Abbildung 75 zeigt das Massenspektrum des Retentionszeitraumes von Minute 16,74 bis 19,75. Den detektierten Massenzahlen unterhalb 646 werden Verschmutzungen zugeordnet, die in den Referenzmessungen des deionisierten Wassers sowie dem reinen Ethanol bereits gemessen werden konnten.

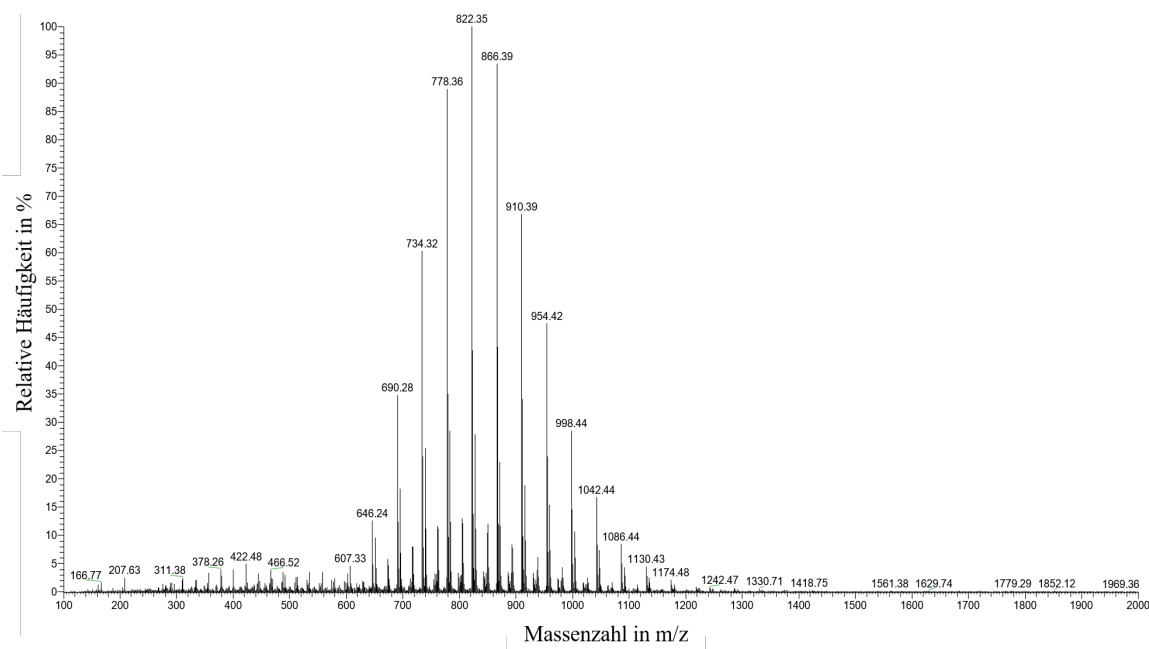


Abbildung 75 Massenzahlen detektierter Substanzen der reinen Monomere im Retentionszeitraum 16,74 bis 19,75 Minuten.

Es können die Massenzahlen 646, 690, 734, 778, 822, 866, 910, 854, 998, 1042, 1086, 1130 und 1174 detektiert werden. Den Massenzahlen im Retentionszeitraum von 16,74 bis 19,75 Minuten werden ethoxylierten BisDMA Molekülen mit zusätzlichem Ammoniumion zugeordnet (vgl. Tabelle 18).

Tabelle 18: Zuordnung der Massenzahlen der Retentionszeit von 16,4 bis 19,7 Minuten.

Massenzahl	Grundsubstanz	Ethoxylierungsgrad	Zusatzsubstanz
646	BisDMA (364 g/mol)	6 x EO (264 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
690	BisDMA (364 g/mol)	7 x EO (308 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
734	BisDMA (364 g/mol)	8 x EO (352 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
778	BisDMA (364 g/mol)	9 x EO (396 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
822	BisDMA (364 g/mol)	10 x EO (440 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
866	BisDMA (364 g/mol)	11 x EO (484 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
910	BisDMA (364 g/mol)	12 x EO (528 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
954	BisDMA (364 g/mol)	13 x EO (572 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
998	BisDMA (364 g/mol)	14 x EO (616 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1042	BisDMA (364 g/mol)	15 x EO (660 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1086	BisDMA (364 g/mol)	16 x EO (704 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1130	BisDMA (364 g/mol)	17 x EO (748 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)

A3: Massenspektrum des Photoinitiators TPO

Die Messung dieses Massenspektrums dient der Erzeugung eines Referenzspektrums für den Photoinitiator TPO, um bei dem späteren Vergleich mit dem Massenspektrum der Eluate gedruckter Probekörper TPO bzw. TPO-Bruchstücke eindeutig identifizieren zu können. Abbildung 76 zeigt die Retentionszeiten detektierter Substanzen des reinen Photoinitiators TPO.

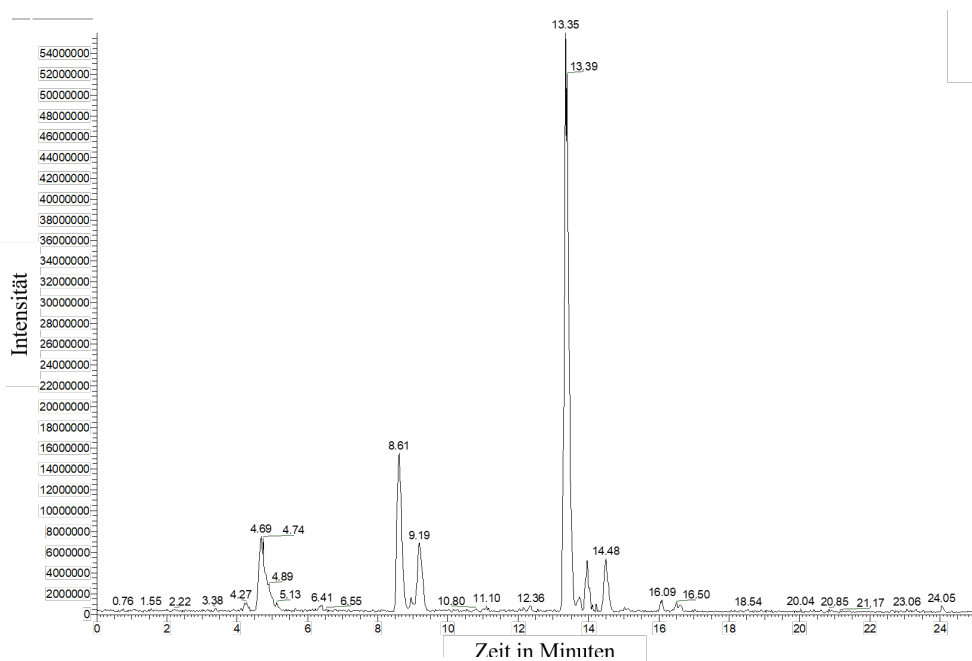


Abbildung 76: Intensität detektierte Substanzen des Photoinitiator TPO gegenüber Retentionszeiten: Es können Banden zwischen ca. 4 bis 5 Minuten, 8,5 bis 9,2 Minuten, 14 bis 15,5 Minuten sowie zu 16 und 17 Minuten gemessen werden.

Es können Banden zwischen Minute 4 bis 5 sowie zwischen 8,5 bis 9,2 und 14 bis 15,5 erkannt werden. Die detektierten Massen können den bereits bekannten Verunreinigungen aus der Messung des deionisierten Wassers sowie des Ethanol zugewiesen werden. TPO-Moleküle mit einer erwarteten Masse von 348 g/mol können nicht nachgewiesen werden. Auffällig ist jedoch die oftmals detektierte Substanz mit einer Massenzahl von 219,08 (vgl. Abbildung 77). Das entspricht der molaren Masse des Spaltprodukts des TPO nach dem Aufbrechen durch energiereiche Strahlung und einem zusätzlichen Proton. Es wird vermutet, dass beim Durchlaufen des UV-Detektors der HPLC-Anlage die Energie der UV-Strahlung von 220 nm das TPO spaltet und das Spaltprodukt somit detektiert werden kann.

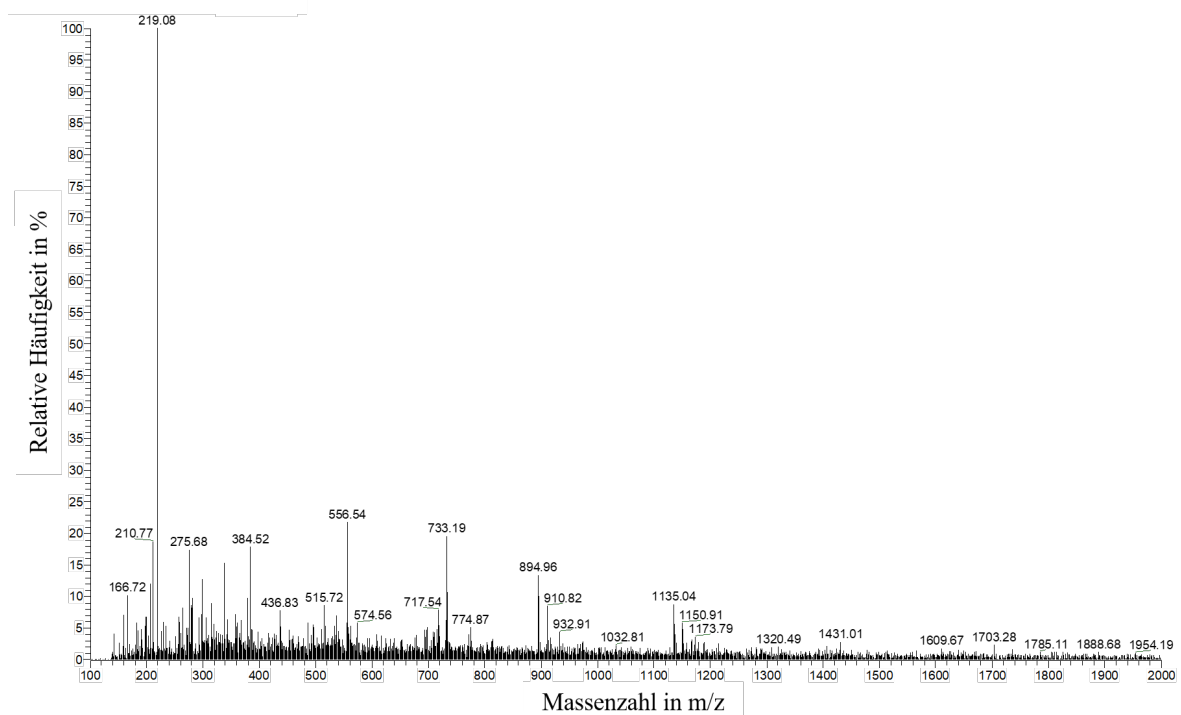


Abbildung 77: Massenzahlen detektierter Substanzen des Photoinitiators TPO im Retentionszeitraum von 4,02 bis 5,24 Minuten.

A4: Massenspektrum des UV-Stabilisators

Die Messung dieses Massenspektrums dient der Erzeugung eines Referenzspektrums für die im Photopolymer verwendeten UV-Stabilisatoren, um bei dem späteren Vergleich mit dem Massenspektrum der Eluate gedruckter Probekörper diese eindeutig identifizieren zu können.

Abbildung 78 zeigt die Retentionszeiten detektierter Substanzen des reinen UV-Stabilisators des Photopolymers gegenüber der Intensität.

Zur Retentionszeit von 14,65 Minuten kann ein intensiver Peak detektiert werden. Die Massenzahlen der detektierten Substanzen können in Abbildung 79 gesehen werden. Es kann eine Substanz mit einer Massenzahl von 226,10 detektiert werden. Die molare Masse des UV-Stabilisators beträgt 225,25 g/mol. Die detektierte Substanz kann also dem UV-Stabilisator mit einem zusätzlichen Proton zugeordnet werden.

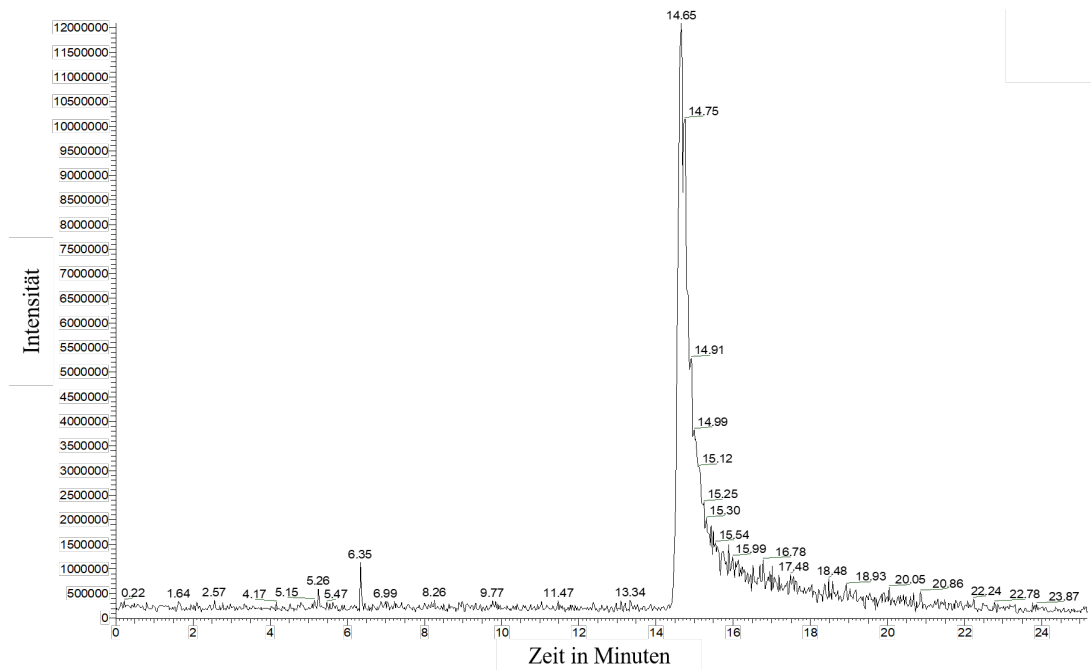


Abbildung 78: Intensität detektierter Substanzen des UV-Stabilisators gegenüber Retentionszeiten: Es kann ein intensiver Peak zur Retentionszeit von 14,65 Minuten detektiert werden.

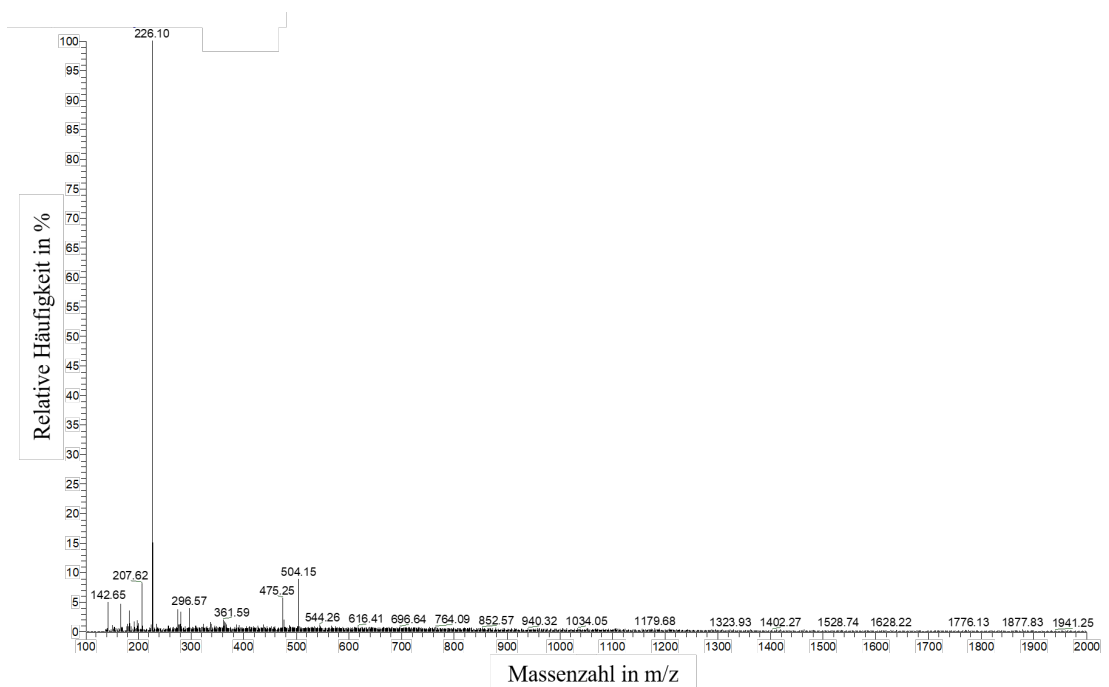


Abbildung 79: Massenzahlen detektierter Substanzen des UV-Stabilisators im Retentionszeitraum von 13,99 bis 17,14 Minuten.

A5: Massenspektrum des hergestellten Eluates aus additiv gefertigten Probekörpern

Die Messung dieses Massenspektrums dient der Erzeugung der Massenspektren der Eluate gedruckter Probekörper. Durch den Vergleich mit den Referenzmassenspektren sollen die herauslösbaren Bestandteile charakterisiert und die Hauptbestandteile dieser eindeutig identifiziert werden. Auf Grund der hohen Anzahl an gemessenen Spektren werden in diesem Abschnitt nur ausgewählte Spektren gezeigt, die zur Charakterisierung der herauslösbaren Bestandteile benötigt werden.

Abbildung 80 zeigt die Retentionszeit detektierter Substanzen des in deionisiertem Wasser bei 37 °C gewonnenen Eluats von additiv gefertigten Probekörpern.

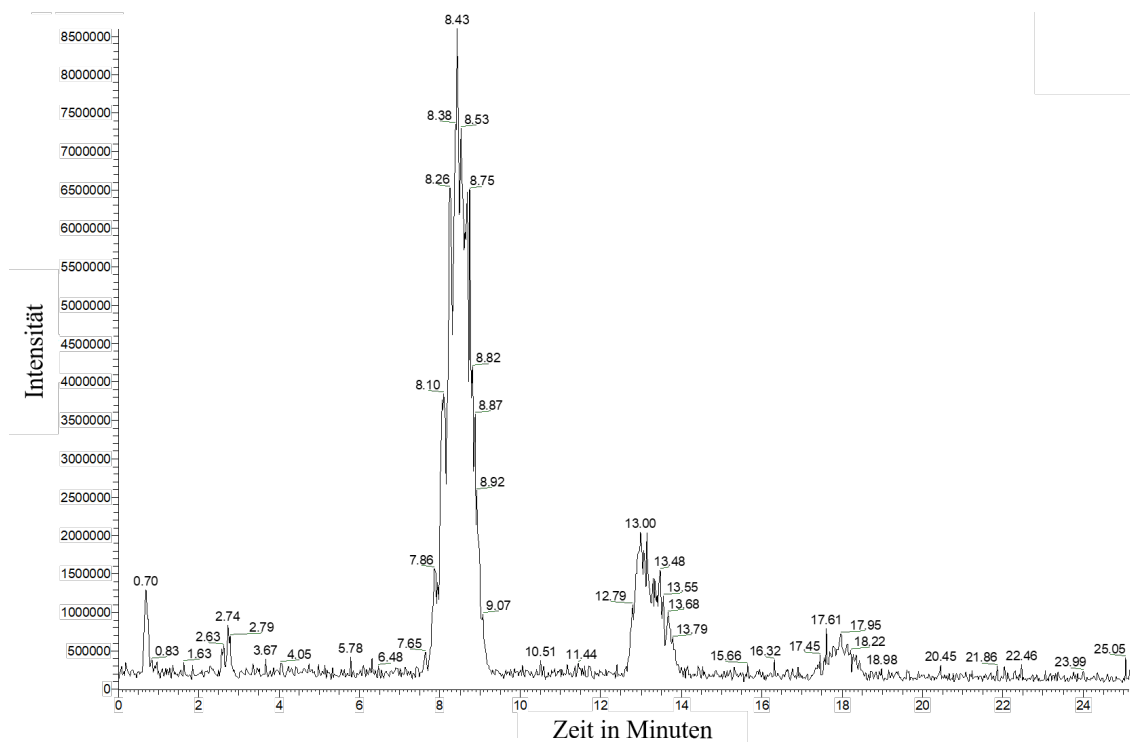


Abbildung 80: Intensität detektierter Substanzen des in deionisiertem Wasser bei 37 °C gewonnenen Eluats aus additiv gefertigten Probekörpern gegenüber der Retentionszeit.

Den Massenzahlen der ersten beiden Peaks zu den Retentionszeiten von 0,7 Minuten und 2,6 Minuten können lediglich die Massenzahlen der Verschmutzungen zugeordnet werden. Nach einer Retentionszeit von 7,4 bis 9,9 Minuten ist ein starker Peak zu erkennen. In einem Retentionszeitraum von 12,3 bis 14,4 Minuten folgt eine Bande mittlerer Intensität. Eine Bande mit schwacher Intensität folgt zu einem Retentionszeitraum von 17 bis 19,1 Minuten.

Abbildung 81 zeigt die Massenzahlen detektierter Substanzen während des Retentionszeitraums von 7,44 bis 9,83 Minuten.

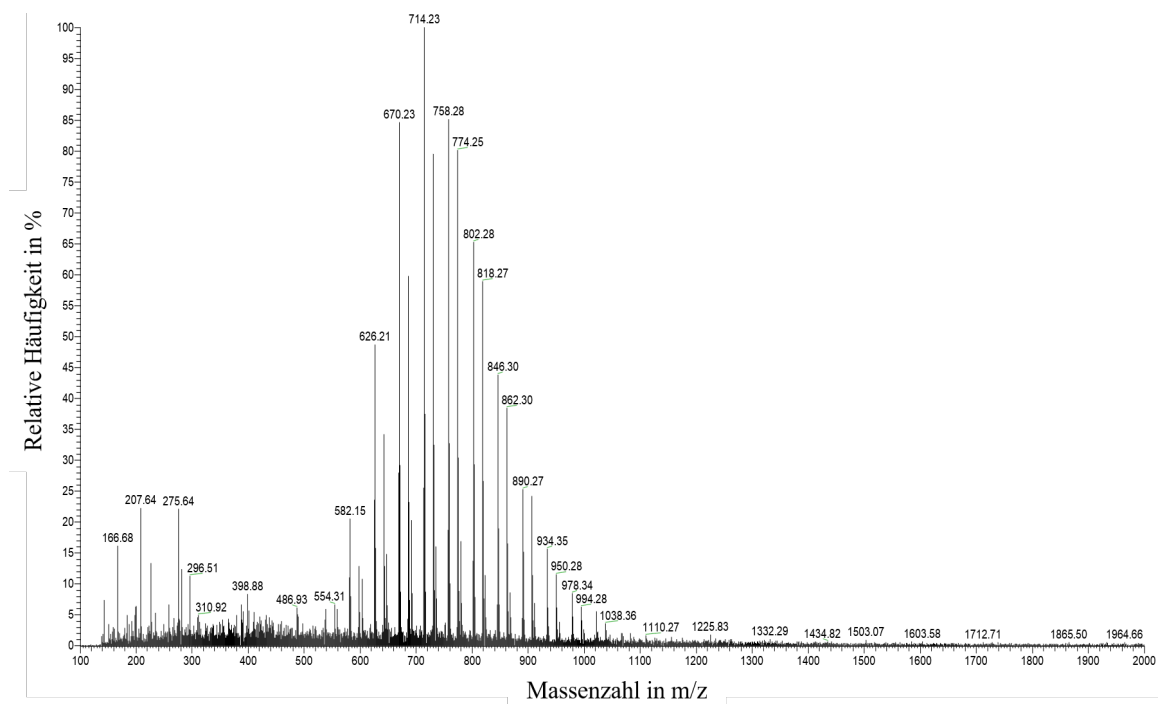


Abbildung 81: Massenzahlen detektierter Substanzen des in deionisierten Wasser bei 37 °C gewonnen Eluats im Retentionszeitraum 7,44 bis 9,83 Minuten.

Während der Retentionszeit von 7,44 Minuten bis 9,83 Minuten können die Massenzahlen 166, 207, 275, und 296 detektiert werden. Diese werden den, in den Referenzmessungen mit reinem Wasser sowie reinem Ethanol gemessenen Verunreinigungen zugeordnet.

Weiterhin können die Massenzahlen 582, 626, 670 714, 758, 802, 846, 890, 934, 978 detektiert werden. Diesen Massenzahlen werden ethoxylierten BisA Molekülen mit zwei zusätzlich anhaftenden Protonen zugeordnet (vgl. Tabelle 19). Weiterhin können die Massenzahlen 774, 818, 862, 906, 950, 994 und 1038 detektiert werden. Diesen Massenzahlen werden ethoxylierten BisA Molekülen mit einem zusätzlichen Ammoniumion zugeordnet (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19: Zuordnung der Massenzahlen der Retentionszeit von 7,4 bis 9,9 Minuten.

Massenzahl	Grundsubstanz	Ethoxylierungsgrad	Zusatzsubstanz
582	BisA (228,3 g/mol)	7 x EO (308 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
626	BisA (228,3 g/mol)	8 x EO (352 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
670	BisA (228,3 g/mol)	9 x EO (396 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
714	BisA (228,3 g/mol)	10 x EO (440 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
758	BisA (228,3 g/mol)	11 x EO (484 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
802	BisA (228,3 g/mol)	12 x EO (528 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
846	BisA (228,3 g/mol)	13 x EO (572 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
890	BisA (228,3 g/mol)	14 x EO (616 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
934	BisA (228,3 g/mol)	15 x EO (660 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
978	BisA (228,3 g/mol)	16 x EO (704 g/mol)	2 x Proton (2 g/mol)
774	BisA (228,3 g/mol)	12 x EO (528 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
818	BisA (228,3 g/mol)	13 x EO (572 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
862	BisA (228,3 g/mol)	14 x EO (616 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
906	BisA (228,3 g/mol)	15 x EO (660 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
950	BisA (228,3 g/mol)	16 x EO (704 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
994	BisA (228,3 g/mol)	17 x EO (748 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1038	BisA (228,3 g/mol)	18 x EO (792 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)

Abbildung 82 und Abbildung 83 zeigen die Massenzahlen detektierter Substanzen während des Retentionszeitraums von 12,31 bis 14,37 Minuten und 16,98 bis 19,14 Minuten. Neben den bereits bekannten Verschmutzungen können hydrolysierte BisDMA Moleküle unterschiedlicher Ethoxylierungsgrade mit anhaftenden Ammoniumion (vgl. Tabelle 20) sowie BisDMA Moleküle unterschiedlicher Ethoxylierungsgrade mit anhaftenden Ammoniumion (vgl. Tabelle 21).

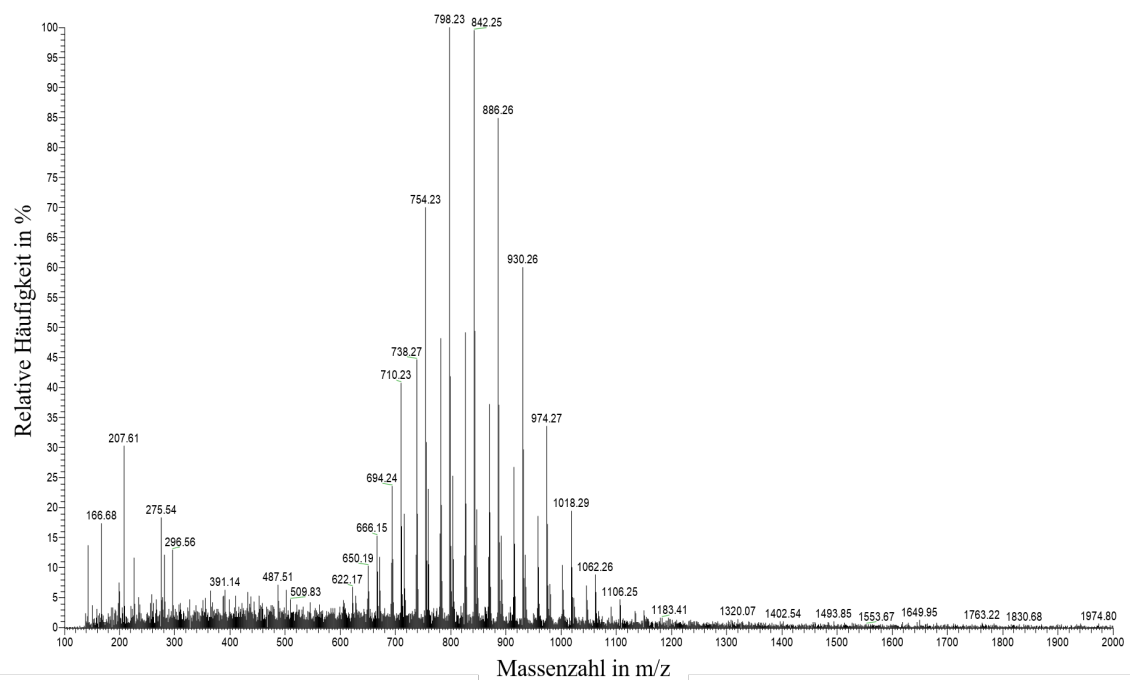


Abbildung 82: Massenzahlen detektierter Substanzen des in deionisiertem Wasser bei 37 °C gewonnen Eluats im Retentionszeitraum 12,31 bis 14,37 Minuten.

Tabelle 20: Zuordnung der Massenzahlen der Retentionszeit von 12,3 bis 14,37 Minuten.

Massenzahl	Grundsubstanz	Ethoxylierungsgrad	Zusatzsubstanz
622,3	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	5 x EO (220 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
666,2	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	6 x EO (264 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
710,3	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	7 x EO (308 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
754,3	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	8 x EO (352 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
798,3	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	9 x EO (396 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
842,3	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	10 x EO (440 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
886,3	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	11 x EO (484 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
930,3	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	12 x EO (528 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
974,3	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	13 x EO (572 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1018,3	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	14 x EO (616 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1062,3	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	15 x EO (660 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1106,3	Hydr. BisDMA (384.3 g/mol)	16 x EO (704 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)

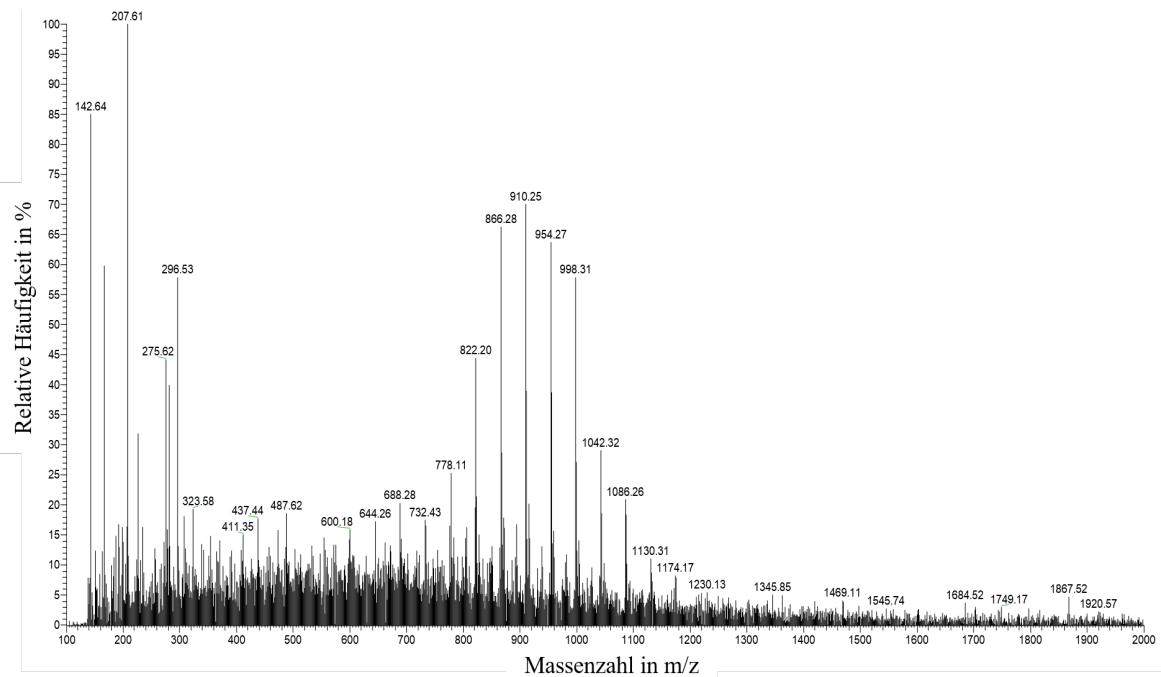


Abbildung 83: Massenzahlen detektierter Substanzen des in deionisiertem Wasser bei 37 °C gewonnen Eluats im Retentionszeitraum 16,98 bis 19,14 Minuten.

Tabelle 21: Zuordnung der Massenzahlen der Retentionszeit von 17 bis 19,1 Minuten.

Massenzahl	Grundsubstanz	Ethoxylierungsgrad	Zusatzsubstanz
778	BisDMA (384.3 g/mol)	9 x EO (396 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
822	BisDMA (384.3 g/mol)	10 x EO (440 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
866	BisDMA (384.3 g/mol)	11 x EO (484 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
910	BisDMA (384.3 g/mol)	12 x EO (528 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
954	BisDMA (384.3 g/mol)	13 x EO (572 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
998	BisDMA (384.3 g/mol)	14 x EO (616 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1042	BisDMA (384.3 g/mol)	15 x EO (660 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1086	BisDMA (384.3 g/mol)	16 x EO (704 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1130	BisDMA (384.3 g/mol)	17 x EO (748 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)
1174	BisDMA (384.3 g/mol)	18 x EO (792 g/mol)	NH ₄ (18 g/mol)